



MARCILENE REZENDE SILVA

**POLIMORFISMO DO GENE DA TIOPURINA
METILTRANSFERASE (TPMT) EM UMA POPULAÇÃO DE
CRIANÇAS E ADOLESCENTES COM LEUCEMIA
LINFOCÍTICA AGUDA**

BELO HORIZONTE

2007

Marcilene Rezende Silva

**“POLIMORFISMO DO GENE DA TIOPURINA METILTRANSFERASE (TPMT)
EM UMA POPULAÇÃO DE CRIANÇAS E ADOLESCENTES COM LEUCEMIA
LINFOCÍTICA AGUDA”**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, com vistas à obtenção do título de mestre em Ciências da Saúde na Área de Concentração Saúde da Criança e do Adolescente.

Orientadora: Dra. Benigna Maria de Oliveira

Co-orientador: Dr. Alvaro José Romanha.

Belo Horizonte

2007

S586p Silva, Marcilene Rezende
Polimorfismo do gene da Tiopurina Metiltransferase (TPMT) em uma população de crianças e adolescentes com Leucemia Linfocítica Aguda (LLA)/Marcilene Rezende Silva. Belo Horizonte, 2007.
124f., il.
Dissertação.(mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Medicina.
Área de concentração: Ciências da Saúde e do Adolescente
Orientadora: Benigna Maria de Oliveira
Co-orientador: Alvaro José Romanha
1.Polimorfismo de um único nucleotídeo 2.Metiltransferases/genética
3.Leucemia linfocítica aguda/quimioterapia 4.6-mercaptopurina/administração & dosagem 5. Tolerância a drogas/genética 6.Reação em cadeia da polimerase 7.Farmacogenética 8.Criança 9.Adoloscete

NLM: QH 455
CDU: 575.24

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE MEDICINA
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO SAÚDE DA CRIANÇA E DO
ADOLESCENTE

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Reitor: Ronaldo Tadêu Pena

Vice-Reitora: Heloisa Maria Murgel Starling

Pró-reitor de Pós-graduação: Jaime Arturo Ramirez

FACULDADE DE MEDICINA

Diretor: Francisco José Penna

Vice-diretor: Tarcizo Afonso Nunes

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE – ÁREA
DE CONCENTRAÇÃO SAÚDE DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE

Coordenador: Prof. Joel Alves Lamounier

Subcoordenador: Prof. Eduardo Araújo de Oliveira

Colegiado:

Professora Ana Cristina Simões e Silva

Professor Eduardo Araújo de Oliveira

Professor Francisco José Penna

Professora Ivani Novato Silva

Professor Joel Alves Lamounier

Professor Lincoln Marcelo Silveira Freire

Professor Marco Antônio Duarte

Professora Regina Lunardi Rocha

Rute Maria Velasquez Santos (Representante Discente)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por guiar meus passos e colocar pessoas especiais no meu caminho, as quais me auxiliaram, orientaram e propiciaram uma caminhada de sucesso.

Aos meus preciosos orientadores Prof^a. Benigna Maria de Oliveira e Dr. Alvaro José Romanha pela paciência, sábios ensinamentos, oportunidade de aprendizado, orientação, atenção e apoio neste trabalho. Muito obrigada!

A todos colegas do Serviço de Hematologia do Hospital das Clínicas da UFMG que me auxiliaram na realização deste projeto. Ao Prof. Marcos Borato e a Dra Mitiko Murao pela colaboração neste estudo. A Andréa pela companhia nas aulas, amizade e por esclarecer dúvidas. A Prof^a Rachel pela atenção na disciplina Especialidades Pediátricas e a Prof^a Ana Cristina pela oportunidade de aprendizado. A Daniela, aluna de iniciação científica, por me auxiliar na coleta de dados clínicos.

A todos colegas e amigos (as) do Centro de Pesquisa René Rachou: Fernanda Barbosa, Juciane, Luciana, Paula, Poliana, Renata, Marcela, Lívia, Luiza, Rodrigo, Marcos, Gustavo, Anderson, Ademar, Rômulo, Daniel, Rosiane, Mariana, Fernanda Ludolf, Jerônimo, Kely, Simara, Lorenza, Gabriela, Elis, Andréa, Helida, Taís, Regina, Fernanda Costa, Ângela, Dra. Silvane e Dr Guilherme pela ajuda recebida, convivência agradável e amizade.

Ao Flávio e ao Nilton por esclarecer dúvidas, compartilhar conhecimentos, pela amizade e convivência diária.

A Maureen, Rosana, Sílvia, Kênea, João de Deus, e Segemar por me auxiliar, com muita boa vontade, sempre que solicitados. A Carolina pelo auxílio e aprendizado na análise estatística e a Elza pela ajuda na elaboração da ficha catalográfica.

Aos pacientes e pais que aceitaram participar deste estudo.

A Fê Freire pela amizade sincera e por estar ao meu lado dividindo momentos de alegria e ansiedade desde a graduação.

A Mairinha pela presença afável, amizade, carinho e tantas conversas agradáveis.

A Josiane pelo companheirismo, dúvidas compartilhadas e apoio em todos os momentos.

A Sarinha pela amizade, presença cotidiana, conversas científicas, religiosas e filosóficas.

A Flavianne, Natália, Ana Cláudia e Ana Cristina pela amizade, atenção e por estar ao meu lado compartilhando todos os momentos.

Ao Centro de Pesquisa René Rachou – FIOCRUZ, na pessoa do seu diretor, Dr Alvaro José Romanha, pelo auxílio financeiro e disponibilização da infra-estrutura para a realização da parte laboratorial deste trabalho.

Ao laboratório de Parasitologia Celular e Molecular do Centro de Pesquisa René Rachou, na pessoa do seu chefe Dr Guilherme Corrêa de Oliveira, que forneceu auxílio financeiro para minha ida ao Congresso Brasileiro de Genética em Foz do Iguaçu.

A CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

A pró-reitoria de pesquisa da UFMG, CNPq e FAPEMIG pelo financiamento deste projeto.

Aos membros da minha banca examinadora, Dr Guilherme Corrêa de Oliveira, Dra Nelma Cristina Diogo Clementino e Dr Marcos Borato Viana por aceitarem o convite e dedicarem atenção a minha dissertação.

A minha mamãe e meu papai um agradecimento especial pelo amor, dom da vida, carinho, presença, ajuda, torcida e oportunidades.

Ao Jonas, meu anjinho, pelo amor, paciência, carinho, estímulo e incentivo, e às minhas irmãs Josi, Dri, Lú, cunhados Ricardo, Antonino, Iguatiman e sobrinhas Fernanda e Caroline pelos momentos de descontração, apoio, torcida e carinho.

A tia Cida, João, Vinicius e a todos amigos e familiares que me incentivaram nesta caminhada. A Ana Rita, Cliviany, Josana, Johan, Quincas, Renato, Sara, Alessandra, e todos os meus familiares de coração que torceram por mim.

Enfim, muito obrigada a todos que me ajudaram no desenvolvimento deste trabalho.

SUPORTE FINANCEIRO

Este estudo recebeu suporte financeiro da FAPEMIG, da Pró-Reitoria de Pesquisa da UFMG, do Centro de Pesquisa René Rachou - FIOCRUZ, do CNPq e da CAPES.

RESUMO

Introdução: A 6-mercaptopurina (6-MP) é o principal componente da maioria dos esquemas de quimioterapia na fase de manutenção do tratamento da leucemia linfocítica aguda (LLA). A Tiopurina Metiltransferase (TPMT) é uma das enzimas responsáveis pelo metabolismo da 6-MP. Diversos estudos demonstram um polimorfismo genético de caráter autossômico co-dominante para a TPMT em humanos. O metabolismo da 6-MP é intensamente afetado por esse polimorfismo.

Objetivos: Estimar a frequência das três principais variantes alélicas do gene *TPMT*: *2 (238G>C), *3A (460G>A e 719A>G) e *3C (719A>G) em uma população e crianças e adolescentes com LLA tratados no Hospital das Clínicas – UFMG. Correlacionar o genótipo com dados clínicos e laboratoriais obtidos durante a fase de manutenção da quimioterapia e com a concentração intra-eritrocitária dos metabólitos da 6-MP (nucleotídeos da 6-tioguanina, 6-TGN e metilmercaptopurina, MMP).

Métodos: Amostras de DNA de 116 pacientes foram extraídas, sendo 95 a partir de sangue total, 13 de concentrado de hemácias e 8 de esfregaço de medula óssea. Inicialmente, a PCR alelo específica foi otimizada separadamente para cada *locus*, utilizando-se a estratégia do sistema de amplificação refratário a mutações (ARMS). A PCR em *multiplex* foi possível somente com preparado de DNA de sangue total. Os dados clínicos e laboratoriais foram coletados, retrospectivamente, em prontuários médicos.

Resultados: Doze dos 116 pacientes (10,3%) apresentaram mutação no gene *TPMT*, todas em heterozigose. A variante alélica mais frequente foi a *TPMT**3A (9/232 alelos; 3,9%), seguido pela *3C (2/232; 0,9%), *2 (1/232; 0,4%) e *3B (nenhum alelo; 0%). Não houve diferença significativa nas medianas da contagem de leucócitos e neutrófilos, quando os grupos de pacientes com e sem mutação foram comparados. Também o tempo de interrupção da quimioterapia de manutenção foi semelhante nos dois grupos. A média das doses prescritas de 6-MP situou-se abaixo da dose preconizada pelo protocolo em ambos os grupos e a mediana da contagem de leucócitos e neutrófilos durante o tratamento de manutenção ficou acima da preconizada pelos protocolos de tratamento. Entre os 36 pacientes com dosagem de metabólitos da 6-MP, apenas um apresentou mutação (*TPMT**1/*3C). Neste paciente foram encontradas altas concentrações intra-eritrocitárias

de 6-TGN e baixas concentrações de MMP. Portanto, não foi possível a realização de análises estatísticas para avaliação da relação entre o genótipo e a concentração de metabólitos da 6-MP. A sobrevida livre de eventos aos 8,5 anos para todo o grupo foi de 75,1% (IC 95%: 60,8% a 84,8%). Não foi observada diferença na sobrevida livre de eventos quando comparados os grupos com e sem mutação ($p = 0,06$).

Conclusões: Os nossos resultados em pacientes brasileiros coincidem com os da literatura, uma vez que o alelo variante *TPMT*3A* é o mais freqüente na maioria das populações. Vários indícios encontrados no presente estudo sugerem que a intensidade da quimioterapia pode não ter sido suficiente para se alcançar uma mielossupressão adequada, principalmente no grupo de pacientes com mutação do gene *TPMT*. Isso explicaria porque não se encontraram diferenças significativas no prognóstico dos grupos com e sem mutação do gene da *TPMT*. A incorporação da genotipagem à rotina de acompanhamento dos pacientes tratados no Serviço de Hematologia do Hospital das Clínicas da UFMG poderia ser uma ferramenta auxiliar na otimização das doses de 6-MP, minimizando riscos de toxicidade e contribuindo para uma melhor abordagem diagnóstica e terapêutica.

ABSTRACT

Introduction: 6-mercaptopurine (6-MP) is the main component of chemotherapy treatment in the maintenance phase of Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL). Thiopurine Methyltransferase (TPMT) is one of the enzymes responsible for 6-MP metabolism. Several studies have shown a genetic polymorphism of autosomal codominant inheritance in the *TPMT* gene in humans patients. The metabolism of 6-MP is intensively affected by this polymorphism.

Aim: To study the frequency of the main *TPMT* gene allelic variants, *2 (238G>C), *3A (460G>A and 719A>G) and *3C (719A>G) in a population of ALL children and adolescents treated at Federal University of Minas Gerais. To verify the correlation between the genotype, clinical and laboratory data from patients during the maintenance phase of chemotherapy and the 6-MP metabolites (nucleotides of 6-tioguanine, 6-TGN and methylmercaptopurine, MMP) concentration in erythrocytes.

Methods: A group of 116 patients was studied. DNA samples were extracted, 95 from whole blood, 13 from packed red cells and 8 from bone marrow smears. First, the PCR was optimized separately for each *locus* of the gene *TPMT* by amplification refractory mutation system (ARMS). Multiplex PCR was performed only when DNA extracted from whole blood was used. Clinical and laboratory data were retrospectively collected from medical files.

Results: From 116 patients studied, twelve (10,3%) presented mutation in heterozygosity. The *TPMT**3A (9/232 alleles; 3,9%) was the most frequent allelic variant, followed by *3C (2/232; 0,9%), *2 (1/232; 0,4%) and *3B (no allele; 0%). There was no significant difference in the median of white blood cell count (WBC) and absolute neutrophil count (ANC) between the groups of patients, with and without gene mutation. The maintenance chemotherapy interruption time was similar in both groups. The 6-MP average dose prescribed was lower than the protocol dose in both groups and the WBC and ANC median counts during the maintenance treatment were higher than those assigned by the treatment protocols. Only one out of 36 patients with dosage of 6-MP presented a mutation (*TPMT**1/*3C). This patient presented high erythrocyte 6-TGN concentration and low MMP concentration. Therefore, the statistical analysis to evaluate the correlation between

the genotype and the concentration metabolites of the 6MP was not possible. The 8.5-year estimated probability of event free survival (EFS) was 75.1% (IC 95%: 60.8%-84.8%). The event free survival curves for patients with mutation were not statistically different from those for patients without mutation ($p = 0,06$).

Conclusions: Our results with Brazilian patients are in accordance with the literature that the allele variant *TPMT*3A* is also the most frequent in majority of populations. Some signs found in the present study suggest that the chemotherapy dosage was not sufficient to achieve adequate mielotoxicity, especially in the group of patients with *TPMT* gene mutation. This might explain the lack of prognostic difference between the groups of patients, with and without *TPMT* gene mutation. Genotyping for monitoring the patients treatment may be useful tool. The technique could be used for 6-MP dosage optimization, minimizing toxicity risks and contributing to a better diagnostic and therapeutic approach.

LISTA DE ABREVIATURAS

6-MeTIMP - 6-metil tioinosina 5'-monofosfato
6-MP - 6-mercaptopurina
6-TGN- nucleotídeos da 6-tioguanina
A260 - absorvância 260 nanômetros
A280- absorvância 280 nanômetros
Ala - Alanina
Arg – Arginina
AR- alto risco
ARA-C- Arabinosil citosina
ARMS - Sistema de Amplificação Refratário a Mutação
cDNA - Ácido Desoxiribonucléico complementar
CENS1 - variável de censura para sobrevida livre de eventos
CENS2 - variável de censura para sobrevida global
Cis - Cisteína
CN - controle negativo
COEP - Comitê de Ética em Pesquisa
CP - controle positivo
DHFR - Dihidrofolato Redutase
DHPLC - Cromatografia Líquida Desnaturante de Alta Eficiência
dNTPs - Desoxirribonucleotídeos
DXM - Dexametasona
DNA - Ácido Desoxiribonucléico
DNPS - Síntese *de novo* de purinas
EDTA - Etilenodiaminotetracetato
Fen - Fenilalanina
GBTLI - Grupo Cooperativo Brasileiro para Tratamento da Leucemia Infantil
Gli - Glicina
Gln- Glutamina
Glu - Ácido Glutâmico

GMPS - Guanosina Monofosfato Sintetase
HC - Hospital das Clínicas
His - Histidina
HGPRT - Hipoxantina-guanina-fosforibosiltransferase
HPLC - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
IC - intervalo de confiança
IDADEX - Idade ao diagnóstico
IMPD - Inosina Monofosfato Desidrogenase
LLA - Leucemia Linfocítica Aguda
Leu - Leucina
LEUINI - Leucometria ao diagnóstico
Lis - Lisina
Leu - Leucina
MADIT - Terapia Tríplice Intratecal: metotrexato (MTX), Arabinosil citosina (ARA-C) e Dexametasona (DXM).
MEDLEU - Mediana das contagens de leucócitos
MEDNEUT - Mediana das contagens de neutrófilos
MRC/UK - Grupo de tratamento da Leucemia Infantil do Reino Unido
Met - Metionina
MMP - Metilmercaptapurina
MPO - Mieloperoxidase
mRNA - Ácido Ribonucléico Mensageiro
MTX - Metotrexato
MUT - Mutado
ng - nanogramas
nm - nanômetros
NOPHO - Grupo de Tratamento da Leucemia Infantil dos países Nórdicos
PCR - Reação em Cadeia da Polimerase
PDN - Prednisona
Pro - Prolina
QT - Quimioterapia

QTT - Tempo de interrupção da quimioterapia durante a fase de manutenção

RB- Risco Básico

RBV- Risco Básico Verdadeiro

RCC- Remissão Clínica Completa

RFLP - Polimorfismo do Comprimento do Fragmento de Restrição

RNA - Ácido Ribonucléico

SAME - Serviço de Arquivo Médico

Ser - Serina

SG - Sobrevida Global

SLE - Sobrevida Livre de Evento

SNC - Sistema nervoso central

SNP - Polimorfismo de um único nucleotídeo

SSCP - Polimorfismo de conformação de fita única

SUS - Sistema Único de Saúde

THF - Tetrahydrofolato

TIMP - Tiocina 5'-monofosfato

Tir - Tirosina

TGMP - Tioguanina Monofosfato

TMO - Transplante de Medula Óssea

TPMT - gene da Tiopurina Metiltransferase

TPMT - enzima Tiopurina Metiltransferase

Tre - Treonina

Tri - Triptofano

TXMP - Tioxantina Monofosfato

UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais

WT - selvagem (*wild type*)

Val - Valina

VCR - Vincristina

VNTR - Repetição em tandem de número variável

XO - Xantina Oxidase

µl - microlitro

SUMÁRIO	PAG
AGRADECIMENTOS.....	v
SUPORTE FINANCEIRO.....	vii
RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	x
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xii
LISTA DE FIGURAS.....	xviii
LISTA DE TABELAS.....	xx
1- INTRODUÇÃO.....	1
1.1- LEUCEMIA LINFOCÍTICA AGUDA (LLA).....	3
1.2- O TRATAMENTO DA LLA.....	5
1.2.1- O METABOLISMO DA 6-MERCAPTOPURINA (6-MP).....	7
1.3- TIOPURINA METILTRANSFERASE (TPMT).....	12
1.3.1- POLIMORFISMO GENÉTICO DA TPMT EM DIFERENTES POPULAÇÕES.....	17
1.3.2- MÉTODOS PARA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA TPMT.....	20
1.3.3- O POLIMORFISMO GENÉTICO DA TPMT E SUA IMPORTÂNCIA CLÍNICA PARA AS CRIANÇAS COM LLA.....	26
2- OBJETIVO GERAL.....	31
2.1-OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	31
3- PACIENTES E MÉTODOS.....	32
3.1- ASPECTOS ÉTICOS.....	32
3.2- PACIENTES.....	32
3.3- ESQUEMAS TERAPÊUTICOS.....	33
3.3.1- GBTLI LLA - 93	33
3.3.2- GBTLI LLA - 99.....	36
3.3.2.1- GRUPO DE BAIXO RISCO DE RECIDIVA (BR).....	36
3.3.2.2- GRUPO DE ALTO RISCO DE RECIDIVA (AR).....	38
3.4- DADOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS.....	38
3.5- ISOLAMENTO DE DNA GENÔMICO.....	39
3.5.1- MÉTODO DO DNAZOL (INVITROGEN).....	40

3.5.2- MÉTODO FENOL/CLOROFÓRMIO.....	41
3.5.3- ESFREGAÇO DE MEDULA ÓSSEA EM LÂMINAS CORADAS PELO MÉTODO DE <i>MAY-GRÜNWALD-GIEMSA</i>	41
3.5.4- DOSAGEM DAS AMOSTRAS DE DNA.....	42
3.6- PCR (REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE) – ARMS (SISTEMA DE AMPLIFICAÇÃO REFRAATÓRIO A MUTAÇÃO) MULTIPLEX.....	42
3.6.1- ANÁLISE DOS PRODUTOS DE PCR POR ELETROFORESE EM MINIGÉIS DE POLIACRILAMIDA.....	45
3.7- DOSAGEM DOS METABÓLITOS DA 6-MERCAPTOPURINA (6-MP).....	46
3.8- DEFINIÇÃO DE VARIÁVEIS.....	47
3.9- MÉTODOS ESTATÍSTICOS.....	49
4- RESULTADOS.....	51
4.1- RESULTADOS GLOBAIS.....	51
4.2- ISOLAMENTO DO DNA GENÔMICO.....	52
4.3- OTIMIZAÇÃO DA PCR ARMS ALELO ESPECÍFICA E MULTIPLEX.	53
4.4- FREQUÊNCIA DOS ALELOS <i>TPMT*2, *3A, *3B E *3C</i>	55
4.5- GENÓTIPO <i>versus</i> GÊNERO.....	57
4.6- MEDIANA DA CONTAGEM DE LEUCÓCITOS E NEUTRÓFILOS <i>versus</i> GENÓTIPO.....	58
4.7- TEMPO DE INTERRUÇÃO DE QUIMIOTERAPIA <i>versus</i> GENÓTIPO.....	60
4.8- MÉDIAS DAS DOSES DE 6MP E MTX <i>versus</i> GENÓTIPO.....	61
4.9- CONCENTRAÇÃO INTRA-ERITROCITÁRIA DOS METABÓLITOS MMP E 6-TGN <i>versus</i> GENÓTIPO.....	63
4.10- ANÁLISES DE SOBREVIVÊNCIA.....	65
5- DISCUSSÃO.....	67
5.1 - CONSIDERAÇÕES FINAIS	77
6- CONCLUSÕES.....	79
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	81
8- ANEXOS.....	97

8.1- ANEXO 1: APROVAÇÃO DA CÂMARA DO DEPARTAMENTO DE PEDIATRIA, NO SERVIÇO DE HEMATOLOGIA DO HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA UFMG.....	97
8.2- ANEXO 2: APROVAÇÃO DA DIRETORIA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO DO HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA UFMG.....	99
8.3- ANEXO 3: APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UFMG (COEP-UFMG).....	101
8.4- ANEXO 4: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	103
8.5- ANEXO 5: ESQUEMA TERAPÊUTICO (GBTLI LLA – 93).....	106
8.6- ANEXO 6: ESQUEMA TERAPÊUTICO (GBTLI LLA – 99).....	109
8.7- ANEXO 7: DOSES PRESCRITAS DE 6-MP E MTX E DOSAGENS DA 6-MP, 6-TGN E MMP EM 183 AMOSTRAS DE SANGUE COLETADAS DE 36 CRIANÇAS COM LLA.....	113
8.8- ANEXO 8: TABELA COM OS DADOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS DOS 116 PACIENTES COM LLA INCLUÍDOS NO ESTUDO.....	120

LISTA DE FIGURAS	PAG
FIGURA 1- (A) Estrutura química da Hipoxantina e da 6-Mercaptopurina; B) Pareamento normal: citosina-guanina; C) Pareamento anormal timina-tioguanina.....	8
FIGURA 2- Metabolismo da 6-Mercaptopurina (6-MP).....	9
FIGURA 3- Polimorfismo genético da TPMT e sua relação com a resposta a drogas tiopurinas.....	24
FIGURA 4- Produto de amplificação de DNA de pessoas sem doença hematológica, extraídos pelos métodos do kit DNAzol e fenol-clorofórmio, utilizando o par de iniciador β 2M.....	53
FIGURA 5- Produto de amplificação de DNA de pessoas sem doença hematológica, extraído pelo método Fenol-clorofórmio, mostrando produtos de PCR com os iniciadores β 2M, TPMT719WT, TPMT460WT e TPMT238WT alelo específicos. A) PCR alelo específica; B) PCR- <i>multiplex</i>	54
FIGURA 6- PCR-ARMS multiplex para detecção dos alelos <i>TPMT*1</i> , <i>TPMT*2</i> , <i>TPMT*3A</i> , <i>TPMT*3B</i> e <i>TPMT*3C</i> em crianças com LLA.....	56
FIGURA 7- Frequência alélica do gene <i>TPMT</i> em uma população de 116 pacientes com LLA.....	57
FIGURA 8- Associação entre genótipo e gênero em 116 pacientes com LLA.....	58
FIGURA 9- Associação entre genótipo e mediana de contagem de leucócitos em 109 pacientes com LLA.....	59
FIGURA 10- Associação de genótipo e mediana da contagem de neutrófilos em 100 pacientes com LLA.....	60
FIGURA 11- Associação entre genótipo e porcentagem de tempo de interrupção de quimioterapia (QT) como variável contínua em 115 pacientes com LLA.....	61
FIGURA 12- Associação entre média da dose de 6MP e genótipo em 109 pacientes com LLA.....	62
FIGURA 13- Associação entre média da dose de MTX e genótipo em 109 pacientes com LLA.....	63
FIGURA 14- Comparação da dosagem de 6TGN e genótipo em 36 pacientes com LLA.....	64
FIGURA 15- Comparação da dosagem de MMP e genótipo em 36 pacientes com LLA.....	65

FIGURA 16- Curva de sobrevida livre de eventos para 115 crianças com LLA de acordo com ausência ou presença de mutação no gene *TPMT*..... 66

LISTA DE TABELAS	PAG
TABELA 1- Alelos da Tiopurina metiltransferase (TPMT) e fenótipo de atividade da TPMT em eritrócitos.....	14
TABELA 2- Frequência dos alelos da <i>TPMT</i> em diferentes populações.....	18
TABELA 3- Genótipo da TPMT em diferentes populações.....	19
TABELA 4- Iniciadores utilizados no experimento ARMS <i>multiplex</i> TPMT...	43
TABELA 5- Agrupamento dos iniciadores em ARMS1 e ARMS2.....	44
TABELA 6- Local e momento da ocorrência da primeira recaída leucêmica em 28 crianças.....	52
TABELA 7- Dados clínicos e laboratoriais dos 12 pacientes que apresentaram mutação no gene <i>TPMT</i>	66
TABELA 8- Frequência dos alelos <i>TPMT</i> *2,*3A*,*3B,*3C,*5 e *6 em três estudos brasileiros.....	69

1- INTRODUÇÃO

A leucemia linfocítica aguda (LLA) é a neoplasia mais comum na infância. Atualmente, 70% a 80% das crianças recém-diagnosticadas apresentam uma sobrevida livre de doença prolongada, acima de cinco anos, sendo que a maioria destes pacientes alcançará a cura (PUI & EVANS, 2006).

A quimioterapia combinada constitui o eixo principal de tratamento da LLA (CHESSELS, 2000). A maioria dos esquemas terapêuticos consiste de quatro elementos principais: a indução da remissão, uma fase de consolidação (intensificação) da remissão, a fase de manutenção e o tratamento preventivo da doença no sistema nervoso central (PUI & EVANS, 2006).

A 6-Mercaptopurina (6-MP) é um dos principais componentes da maioria dos esquemas de quimioterapia na fase de manutenção do tratamento. Ela atua como pró-droga e deve sofrer conversão intracelular enzimática para a forma de ribonucleotídeos, antes de exercer atividade citotóxica (GIVERHAUG *et al.*, 1999). As diferenças interindividuais no acúmulo de metabólitos ativos durante o tratamento com 6-MP são consideradas determinantes significativos da toxicidade hematopoiética e dos efeitos antileucêmicos desta droga.

A Tiopurina Metiltransferase (TPMT) é uma das enzimas responsáveis pelo metabolismo da 6-MP. Estudos populacionais e familiares demonstraram um polimorfismo genético de caráter autossômico co-dominante para a TPMT em humanos (WEINSHILBOUM & SLADEK, 1980). O metabolismo da 6-MP é intensamente afetado por este polimorfismo. (CHEOK & EVANS, 2006). As bases moleculares para este polimorfismo genético foram bem estabelecidas com a identificação do gene *TPMT* no cromossomo 6p22.3 (SZUMLANSKI *et al.*, 1996). O alelo selvagem (*wild type*) foi designado *TPMT*1* e os indivíduos com alta atividade enzimática são homozigotos para este alelo (SZUMLANSKI *et al.*, 1996).

Até o momento, foram descritos 25 alelos mutantes que estão associados à baixa e intermediária atividade da enzima TPMT (SALAVAGGIONE *et al.*, 2005; SCHAEFFELER *et al.*, 2006; SASAKI *et al.*, 2006). Os alelos mutantes mais prevalentes são *TPMT*2*, **3A* e **3C*, compreendendo 80% a 95% dos alelos mutantes encontrados em

caucasianos, asiáticos, afro-americanos e africanos. O *TPMT*3A* é o mais prevalente dos três alelos entre os caucasianos (OTTERNESS *et al.*, 1997; YATES *et al.*, 1997; De La MOUREYERE *et al.*, 1998b; HON *et al.*, 1999; COLLIE-DUGUID *et al.*, 1999 McLEOD *et al.*, 1999; GANIERE-MANTEIL *et al.*, 2004; SCHAEFFELER *et al.*, 2004 e 2006; EICHELBAUM *et al.*, 2006; COROMINAS *et al.*, 2006).

A relação entre fenótipo e genótipo está definida para a maioria dos alelos em pacientes com leucemia e voluntários normais. A presença dos alelos *TPMT*2*, **3A*, **3C*, por exemplo, prediz o fenótipo. Os pacientes heterozigotos para estes alelos apresentam atividade enzimática intermediária e os indivíduos homozigotos apresentam deficiência da TPMT (KRYNETSKI *et al.*, 1995; SZUMLANSKI *et al.*, 1996; OTTERNESS *et al.*, 1997;; YATES *et al.*, 1997; COULTHARD *et al.*, 2000; SCHAEFFELER *et al.*, 2001; SCHAEFFELER *et al.*, 2004).

Diversos estudos demonstraram que pacientes com atividade excepcionalmente baixa da TPMT têm grande risco de desenvolverem toxicidade hematológica, ou seja, pancitopenia grave e por vezes até fatal, devido ao acúmulo metabólitos citotóxicos após tratamento com doses habituais de tiopurinas (KRYNETSKI & EVANS, 1999; McLEOD *et al.*, 2000). As crianças com LLA portadoras de deficiência da TPMT, ou seja, homozigotas para os alelos mutantes, podem ser tratadas com sucesso utilizando aproximadamente 10 a 20% das doses convencionais de 6-MP (ARICÓ *et al.*, 2005; CHEOK & EVANS, 2006).

O diagnóstico molecular é uma estratégia importante para detectar, prospectivamente, as deficiências de TPMT e minimizar os riscos de toxicidade. Utilizando-se as tecnologias disponíveis, as análises genótípicas podem predizer com sucesso o nível da atividade da TPMT em mais de 95% dos pacientes (COULTHARD *et al.*, 2000; YATES *et al.*, 1997; SCHAEFFELER *et al.*, 2001; SCHAEFFELER *et al.*, 2004).

O Grupo de Hematologia Pediátrica do Departamento de Pediatria da Faculdade de Medicina da UFMG vem se dedicando ao estudo dos fatores prognósticos nas leucemias infantis. De acordo com a literatura e com os resultados obtidos por esse grupo de pesquisadores, os índices de remissão alcançados em países em desenvolvimento podem ser semelhantes aos de países desenvolvidos, mas os índices de recidiva têm sido maiores nos

países em desenvolvimento. Grande parte destas recidivas acontece durante a fase de manutenção da quimioterapia (VIANA *et al.*, 2001). As possíveis causas para a recidiva durante a fase de manutenção do tratamento da LLA são a resistência às drogas e o efeito insuficiente da quimioterapia. Este último, por sua vez, tem sido atribuído à exposição sistêmica inadequada às drogas, determinada por variações intra e interindividuais em sua farmacocinética, e pelo grau de adesão ao tratamento (RELLING *et al.*, 1999b; PUI *et al.*, 2004; OLIVEIRA *et al.*, 2004b). A identificação de possíveis fatores preditivos de prognóstico ruim é importante para subsidiar um possível aperfeiçoamento da abordagem dos pacientes.

O presente estudo está inserido nessa linha de pesquisa e dá continuidade aos estudos que tiveram como enfoque principal a influência da intensidade da quimioterapia sobre o prognóstico da LLA infantil (OLIVEIRA *et al.*, 1996) e o estudo da adesão ao tratamento (OLIVEIRA, 2002; OLIVEIRA *et al.*, 2004b; OLIVEIRA *et al.*, 2004c). Trata-se de um estudo que pode contribuir para fundamentar uma melhor abordagem diagnóstica e terapêutica para os pacientes com LLA.

1.1- LEUCEMIA LINFOCÍTICA AGUDA (LLA)

A leucemia linfocítica aguda (LLA) representa cerca de 80% dos casos de leucemias infantis. O pico de incidência ocorre entre os dois e quatro anos de idade; observa-se uma ligeira predominância em crianças do sexo masculino (1,3 masculino : 1 feminino) (OLIVEIRA *et al.*, 2004a).

A etiologia das leucemias permanece obscura. Na sua patogênese, parecem estar envolvidos mecanismos genéticos e ambientais. A origem clonal, decorrente da proliferação desordenada de uma única célula progenitora, é fato incontestado na maioria, senão em todas as formas de leucemias humanas (OLIVEIRA *et al.*, 2004a).

As manifestações clínicas da LLA decorrem da inibição da hematopoiese pelas células leucêmicas e os efeitos da infiltração destas células em diversos órgãos e sistemas. A inibição do crescimento e diferenciação das células hematopoiéticas normais não ocorre somente pela ocupação física da medula óssea e competição nutricional por parte das células neoplásicas. Existem várias evidências experimentais de que estas secretam

substâncias inibidoras da mielopoiese. O efeito dessas manifestações é a diminuição da produção de hemácias, granulócitos e plaquetas, causando um quadro de anemia, neutropenia e plaquetopenia no sangue periférico. A maioria dos pacientes com leucemia apresenta blastos leucêmicos no sangue periférico e o envolvimento de baço, fígado e linfonodos. O diagnóstico de leucemia é sugerido pela presença de células blásticas no esfregaço sanguíneo, apesar de que 20% dos casos não apresentam linfoblastos no sangue periférico (OLIVEIRA *et al.*, 2004a).

O diagnóstico da LLA é firmado pela punção aspirativa da medula óssea. O estudo desse tecido revela a substituição do tecido hematopoiético normal por células leucêmicas imaturas. O diagnóstico é confirmado quando mais de 25% das células nucleadas são blastos (OLIVEIRA *et al.*, 2004a).

A classificação da LLA depende da combinação das características citológicas, imunológicas e cariotípicas.

O grupo FAB (franco-americano-britânico) distingue três subtipos morfológicos L1, L2 e L3 baseado no tamanho celular, forma do núcleo, número e proeminência do nucléolo e quantidade e aparência do citoplasma. Essa classificação não reflete a grande diversidade biológica da doença (BENNETT *et al.*, 1976).

Os linfoblastos leucêmicos não apresentam características citoquímicas ou morfológicas específicas. Sendo assim, o diagnóstico de LLA deve ser sempre que possível confirmado pela imunofenotipagem. O estudo imunológico das células leucêmicas pode ser feito por citometria de fluxo. As LLA da infância são derivadas de células de linhagem B em 80% a 85% dos casos. Cerca de 15% das LLA pediátricas são derivadas de linfócitos de linhagem T. Apesar dos casos de LLA poderem ser subclassificados de acordo com o grau de maturação dos linfócitos B ou T, as diferenciações que realmente apresentam importância no que diz respeito à terapêutica, são aquelas que permitem distinguir as leucemias derivadas de precursores de células B, daquelas derivadas de células de linhagem T ou de linfócitos B maduros (FALCÃO, 2002).

Quanto à análise do cariótipo, as LLA revelam inúmeras alterações estruturais como inversões, deleções e translocações. Aproximadamente 80% dos pacientes com LLA apresentam alterações numéricas ou estruturais dos cromossomos. O reconhecimento dessas anormalidades por estudos de citogenética e análises moleculares tem contribuído de

forma importante para o entendimento da patogênese e para o prognóstico da doença (OLIVEIRA *et al.*, 2004a).

Com base nos fatores clínicos e laboratoriais, indicativos de prognóstico, os pacientes podem ser reunidos em grupos de acordo com chances de melhor ou pior resposta ao tratamento: grupos de baixo ou alto risco para recidiva.

O regime terapêutico empregado é, sem dúvida, o fator prognóstico mais importante. Em crianças portadoras de LLA derivada de precursores de células B, a contagem inicial de leucócitos inferior a 50.000 células/mm³ e a idade ao diagnóstico entre um e nove anos têm sido consideradas como fatores prognósticos favoráveis na evolução desses pacientes. Pacientes de outras faixas etárias ou aqueles com contagens de leucócitos mais elevadas são considerados de alto risco para recidiva (OLIVEIRA *et al.*, 2004a). É importante ressaltar que outras características das células leucêmicas, como o índice de DNA, anormalidades citogenéticas, imunofenótipo e resposta inicial ao tratamento, podem interferir e/ou modificar o prognóstico do paciente. A relação entre as características do paciente e o prognóstico pode ser explicada pela presença de anormalidades genéticas específicas (CHESSELS, 1995). Além disso, o estado nutricional deficiente e a condição sócio-econômica precária constituem, igualmente, fatores desfavoráveis para um bom resultado no tratamento (VIANA *et al.*, 2001).

Nas últimas quatro décadas, houve uma melhora significativa no prognóstico das crianças portadoras de LLA. No período anterior à quimioterapia antileucêmica, a doença era uniformemente fatal e a maioria das crianças sobrevivia apenas um a dois meses após o diagnóstico (BEUTLER, 2001). Atualmente, a probabilidade de cura da LLA pode chegar a mais de 80% (PUI & EVANS, 2006).

1.2- O TRATAMENTO DA LLA

A quimioterapia combinada constitui o eixo principal de tratamento da LLA há mais de 30 anos. As crianças portadoras de LLA, com exceção daquelas com LLA derivadas de células B maduras, necessitam de tratamento prolongado, com duração total de dois a três anos, para que se possa evitar recidiva da doença (CHESSELS, 2000). A maioria dos esquemas terapêuticos consiste de quatro elementos principais: a indução da remissão, uma

fase de consolidação (intensificação) da remissão, a fase de manutenção e o tratamento preventivo da doença no sistema nervoso central (PUI & EVANS, 2006).

A primeira fase do tratamento (indução da remissão) tem por objetivo induzir uma remissão completa da doença, isto é, restaurar a hematopoiese normal com desaparecimento de toda a sintomatologia clínica associada. Essa fase geralmente inclui o uso de, no mínimo, três drogas – glicorticóide, vincristina, asparaginase e/ou daunomicina (PUI *et al.*, 2001). Com bom suporte antiinfecioso, hemoterápico e metabólico, a taxa de remissão completa esperada é de 96% a 99%. A resposta clínica incompleta após essa fase de indução indica prognóstico ruim, com altos riscos de falha terapêutica (PUI & EVANS, 1998).

A consolidação ou intensificação constitui uma fase de tratamento intensivo, incluindo vários agentes quimioterápicos, aplicada logo após obter-se a remissão da doença. Seu objetivo é evitar o surgimento de clones resistentes à droga e é capaz de promover remissões mais prolongadas e maior percentagem de cura (PUI *et al.*, 2001).

A fase de manutenção da quimioterapia, na maioria dos protocolos terapêuticos, tem como base o uso diário da 6-Mercaptopurina (6-MP), associada a doses semanais de metotrexato (MTX) e pulsos adicionais de vincristina e esteróides, como prednisona ou dexametasona (CHESSELS, 2000).

O tratamento pré-sintomático do sistema nervoso central (SNC) é um componente essencial dos regimes terapêuticos e consiste de aplicações intratecais periódicas de metotrexato/citarabina e dexametasona, durante todo o tratamento. Atualmente, a radioterapia craniana tem sido reservada apenas para os grupos de pacientes com alto risco de recidiva no SNC. Entre estes estão os pacientes com infiltração leucêmica do SNC ao diagnóstico, leucemia de células T e a LLA com cromossomo Filadélfia (FALCÃO, 2002).

As indicações para o transplante de medula óssea (TMO) durante uma primeira remissão permanecem controversas. O TMO é usualmente indicado para pacientes que não alcançaram a remissão após a primeira fase de indução e para aqueles que apresentaram uma segunda remissão após uma recidiva hematológica. No entanto nas recidivas tardias, ou seja, naquelas que ocorrem depois dos primeiros 30 meses após diagnóstico, consegue-se um índice de resgate entre 40% e 70% com o tratamento quimioterápico, tornando também controverso o papel do TMO nesses casos (UDERZO *et al.*, 2001).

Apesar desses progressos, mesmo nos serviços com altos índices de cura, cerca de 25% das crianças ainda apresentam recidiva da doença. As possíveis causas para a recidiva são a resistência às drogas e o efeito insuficiente da quimioterapia. Este último, por sua vez, tem sido atribuído à exposição sistêmica inadequada às drogas, determinada por variações intra e interindividuais em sua farmacocinética (RELLING *et al.*, 1999b; PUI *et al.*, 2004) e pelo grau de adesão ao tratamento (OLIVEIRA *et al.*, 2004b).

Os diferentes padrões de sensibilidade e resistência às drogas interferem na evolução clínica dos diversos subtipos de LLA. Essas diferenças parecem estar relacionadas a anormalidades genéticas específicas presentes nos blastos leucêmicos (PUI *et al.*, 2004).

Alguns estudos têm avaliado a importância de polimorfismos genéticos no tratamento da LLA. A presença de polimorfismos nos genes que codificam enzimas metabolizadoras, transportadores, receptores e alvos de drogas antineoplásicas resultam em ampla diferença interindividual no que diz respeito à exposição sistêmica às drogas e aos efeitos farmacológicos. O aumento na intensidade da quimioterapia ocasionado por alguns desses polimorfismos pode determinar maior toxicidade dessas drogas, podendo também contribuir para um risco menor de recidivas (PUI & EVANS, 2006).

Além disso, a possível interação de múltiplos polimorfismos genéticos pode influenciar a resposta ao tratamento. Portanto, podem ser necessários modelos farmacogenéticos poligênicos para que se possa estabelecer com maior segurança estratégias terapêuticas adequadas (PUI & EVANS, 2006).

Para que ocorram novos avanços no tratamento da LLA, é essencial que sejam realizados estudos cujo enfoque principal seja o entendimento da patogênese da doença e os mecanismos de resistências às drogas quimioterápicas (PUI *et al.*, 2004; PUI & EVANS, 2006).

1.2.1- O METABOLISMO DA 6-MERCAPTOPURINA (6-MP)

A 6-MP é um análogo do nucleosídeo natural hipoxantina e foi sintetizada por Gertrude Elion e George Hutchins através da substituição do oxigênio por um enxofre no carbono 6 da hipoxantina (Figura 1A) (ELION, 1967 in COULTHARD & HOGARTH,

2005). Como a maioria dos análogos das bases púricas, atua como pró-droga e deve sofrer conversão intracelular enzimática para a forma de ribonucleotídeos, antes de exibir atividade citotóxica (LENNARD, 1992).

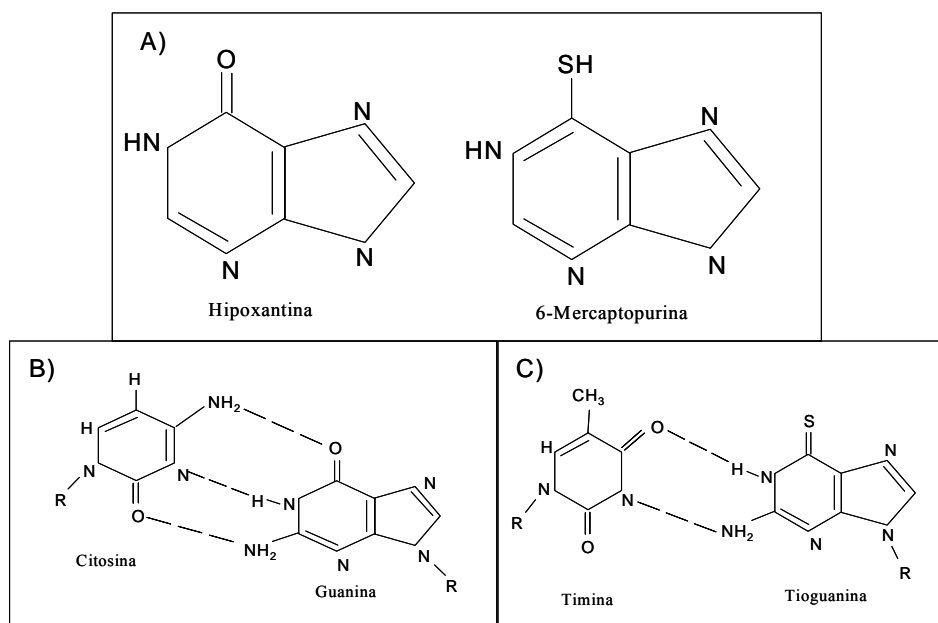


Figura 1- (A) Estrutura química da Hipoxantina e da 6-Mercaptopurina; B) Pareamento normal: citosina-guanina; C) Pareamento anormal timina-tioguanina. A presença de um átomo de enxofre no lugar do oxigênio na tioguanina impede a formação da ponte de hidrogênio normal e leva ao pareamento anormal com a timina. Este pareamento anormal, é reconhecido pelo sistema de reparo da célula, entretanto ela não é capaz de corrigi-lo, induzindo a célula a morte.

As transformações químicas sofridas pela 6-MP após administração oral ocorrem por uma via metabólica com 3 passos competitivos (Figura 2). O primeiro passo do metabolismo ocorre no fígado e na mucosa intestinal. Através da enzima Xantina Oxidase (XO), a 6-MP é transformada no metabólito inativo, o ácido tioúrico (LENNARD, 1992).

A ativação inicial da 6-MP é catalisada pela enzima Hipoxantina-guanina-fosforibosiltransferase (HGPRT). A ativação intracelular resulta na formação de metabólitos ou nucleotídeos ativos, sendo que os principais são os nucleotídeos da 6-tioguanina (6-TGN) (LENNARD, 1992).

O terceiro passo da via metabólica é a tiometilação, catalisada pela enzima Tiopurina Metiltransferase (TPMT). A existência de um polimorfismo no gene da TPMT é responsável pela grande diferença interindividual observada na atividade enzimática da TPMT. Essa via metabólica é exclusiva para as tiopurinas, já que até o momento não foram identificados substratos endógenos para a TPMT. Essa enzima origina um metabólito inativo denominado metilmercaptapurina (MMP) (LENNARD, 1992; BROUWER *et al.*, 2005). Entretanto, a TPMT também é responsável pela metilação da tiomercaptapurina (TIMP), o primeiro metabólito intermediário na via metabólica que leva à formação dos 6-TGN. A formação da 6-metil tiinosina 5'-monofosfato (6-MeTIMP), a partir da TIMP, parece ser importante para a atividade citotóxica da 6-MP, pois inibe a síntese *de novo* das purinas (DNPS) (COULTHARD & HOGARTH, 2005). O metabolismo da 6-MP pelas vias da TPMT e xantina oxidase reduz a formação de 6-TGN ativos (McLEOD *et al.*, 2000).

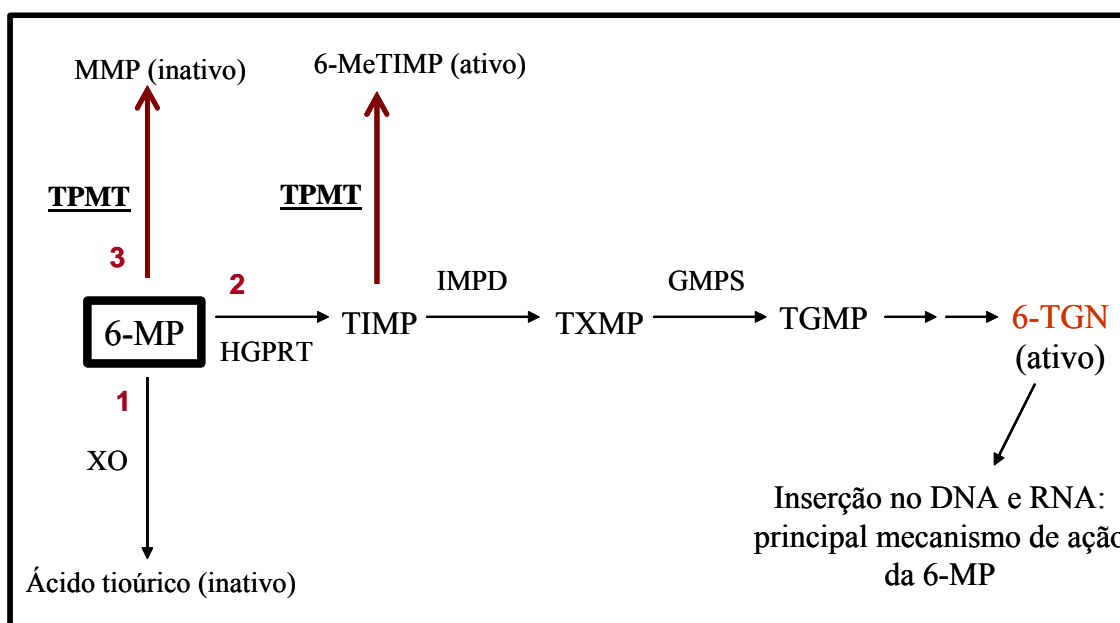


Figura 2- Metabolismo da 6-mercaptopurina (6-MP). 1, 2 e 3 indicam os três passos da via metabólica da 6-MP. TPMT - Tiopurina Metiltransferase; MMP - metilmercaptapurina; XO- xantina oxidase; HGPRT - hipoxantina-guanina-fosforibosiltransferase; TIMP - tiinosina 5'-monofosfato; 6-MeTIMP - 6-metil tiinosina 5'-monofosfato; IMPD - inosina monofosfato desidrogenase; TXMP - tioxantina monofosfato; GMPS - guanosina monofosfato sintetase; TGMP - tioguanina monofosfato; 6-TGN nucleotídeos da 6-tioguanina (COULTHARD *et al.*, 2002).

A incorporação dos metabólitos ativos da 6-MP (6-TGN) ao DNA e RNA é considerada o principal mecanismo de ação da 6-MP (GIVERHAUG *et al.*, 1999). Os 6-TGNs são incorporados ao DNA pareando-se incorretamente com a timina (Figura 1C) (COULTHARD & HOGARTH, 2005). Os 6-TGN incorporados ao DNA no lugar da guanina são reconhecidos pelo sistema de reparo das células em divisão, levando à morte celular por um mecanismo ainda não bem conhecido (SWANN *et al.*, 1996). Defeitos na via de reparo da célula são associados com resistência a 6-TGN (MATHESON & HALL, 1999). Além da incorporação dos nucleotídeos de 6-TGN no DNA sintetizado, um importante componente do mecanismo de ação da 6-MP é a inibição da síntese *de novo* de purinas (DNPS) realizada pelo metabólito 6-MeTIMP (COULTHARD *et al.* 2002).

A absorção da 6-MP por via oral é incompleta. A biodisponibilidade, porcentagem da droga original que tem acesso à circulação sistêmica após administração oral, é pequena (5% a 37%; média de 16%) e com grande variabilidade entre os indivíduos. Esta limitação da biodisponibilidade se deve principalmente ao primeiro passo do metabolismo que leva à formação do ácido tiúrico. Após a administração endovenosa da droga, a meia vida plasmática (tempo requerido para reduzir a concentração da droga a 50%) é relativamente curta, cerca de 50 minutos, em virtude da captação pelas células, excreção renal e rápida degradação metabólica (POPLACK *et al.*, 1986).

Alguns fatores parecem interferir na absorção da 6-MP e contribuir para as variações interindividuais observadas em sua farmacocinética. A 6-MP é mais efetiva quando administrada à noite. Diferentes estudos demonstraram que a sua administração no horário noturno aumenta a exposição sistêmica à droga e a chance de sobrevida livre de doença dos pacientes (KOREN *et al.*, 1990; SCHMIEGELOW *et al.*, 1997). A 6-MP não deve ser ingerida com leite, ou derivados lácteos que contenham xantina oxidase, uma vez que esta enzima pode degradá-la (PUI & EVANS, 2006).

Algumas drogas como folatos e a combinação sulfametoxazol-trimetoprim podem alterar a absorção e o metabolismo da 6-MP, sendo que a última pode potencializar o efeito mielossupressor da quimioterapia (FERRAZZINI *et al.*, 1990). Porém, o exemplo mais conhecido é a interação entre a 6-MP e o alopurinol, um inibidor da xantina oxidase. O tratamento simultâneo com alopurinol aumenta marcadamente a concentração plasmática de 6-MP quando administrada por via oral. Apesar do alopurinol aumentar a

biodisponibilidade da droga, ele não melhora sua atividade anti-leucêmica e potencializa sua toxicidade (ZIMM *et al.*, 1983; ARNDT *et al.*, 1988).

O principal efeito adverso da 6-MP é a mielotoxicidade, que se desenvolve gradualmente. Por isso, pode não haver trombocitopenia, granulocitopenia ou anemia durante várias semanas após o início do tratamento de manutenção. Com a interrupção do tratamento, costuma haver rápida recuperação medular. Efeitos gastrointestinais, como anorexia, náuseas e vômitos são pouco frequentes em crianças (LENNARD, 1992). Pode ocorrer hepatotoxicidade com aumento dos níveis de transaminases e icterícia colestática. Este quadro também costuma ser revertido com a suspensão da droga.

Diversos estudos demonstraram que a hepatotoxicidade parece estar relacionada com o acúmulo de metabólitos metilados como a MMP (DUBINSKY *et al.*, 2000; NYGAARD *et al.*, 2004). Esses achados foram observados com maior frequência em pacientes com alta atividade da TPMT (RELLING *et al.*, 1999a; GILISSEN *et al.* 2007)

Como mencionado anteriormente, a fase de manutenção da quimioterapia, na maioria dos protocolos terapêuticos, tem como eixo principal o uso diário da 6-MP, acompanhada de doses semanais de MTX (CHESSELS, 2000).

A combinação de 6-MP e MTX no tratamento de LLA atua em sinergismo. A eficácia desta combinação parece estar relacionada com o importante papel dessas drogas na inibição da atividade da síntese *de novo* das purinas e em uma provável ação sinérgica da 6-MP e do MTX na apoptose das células tumorais (GIVERHAUG *et al.*, 1999).

O MTX é um análogo estrutural do ácido fólico. O principal mecanismo de ação do MTX é atuar como inibidor competitivo da enzima dihidrofolato-redutase (DHFR), enzima responsável pela conversão do folato na sua forma ativa (tetraidrofolato). O MTX apresenta alta afinidade pela DHFR. Após entrar na célula, o MTX se liga rapidamente à enzima alvo, até que os sítios de ligação enzimática fiquem saturados. Ocorre, então, acúmulo de droga livre no espaço intracelular que passa a ser metabolizada para a forma de poliglutamatos. Os poliglutamatos do MTX atravessam com dificuldade a membrana celular, o que acarreta aumento da concentração intracelular da droga. Na presença do MTX em excesso, a quantidade intracelular de tetraidrofolato reduz-se drasticamente. Os folatos são indispensáveis para reações intracelulares, incluindo síntese dos nucleotídeos

purinos e pirimídicos. Dessa forma, a ação do MTX ocasiona redução da síntese de DNA e inibição da divisão celular (GIVERHAUG *et al.*, 1999).

Alguns estudos indicam que a administração de MTX concomitantemente à 6-MP aumentaria a biodisponibilidade da 6-MP. O mecanismo provável é a inibição da enzima xantina oxidase pelo MTX (GIVERHAUG *et al.*, 1999).

A 6-MP e o MTX inibem a síntese *de novo* de purinas (GIVERHAUG *et al.*, 1999). A síntese *de novo* é uma via de biossíntese de nucleotídeos que utiliza precursores metabólicos importantes (aminoácido, ribose 5-fosfato, CO₂ e NH₃) para formação do DNA celular. A inibição desta via limita as velocidades de replicação e transcrição do DNA, o que é particularmente importante para a interrupção da reprodução de clones leucêmicos. Além disto, o metabolismo celular fica prejudicado, pois os nucleotídeos, principalmente os purinos, são carregadores de energia, componentes de coenzimas, mensageiros químicos, além de precursores do DNA e RNA (NELSON & COX, 2002).

O uso concomitante das duas drogas pode levar, também, a um aumento na formação e incorporação de 6-TGN ao DNA e RNA (GIVERHAUG *et al.*, 1999; DERVIEUX *et al.*, 2002).

1.3- TIOPURINA METILTRANSFERASE (TPMT)

A TPMT é uma enzima citosólica humana e catalisa a S-metilação de drogas chamadas tiopurinas, como 6-MP, 6-tioguanina (6-TG) e azatioprina (SALAVAGGIONE *et al.*, 2005). O acúmulo celular de metabólitos ativos da 6-MP (6-TGN) está inversamente relacionado com a atividade da TPMT (RELLING *et al.*, 1999a), possivelmente porque indivíduos com alta atividade da TPMT têm maior quantidade de 6-MP desviada para a via da tiometilação, restando menor quantidade da droga para ser metabolizada na via de ativação que leva à formação dos 6-TGN (Figura 2).

A herança autossômica co-dominante do polimorfismo do gene *TPMT* que regula a atividade da TPMT foi demonstrada por WEINSHILBOUM e SLADEK em 1980. Aproximadamente 90% dos caucasianos e afro-americanos apresentam alta atividade enzimática, 10% apresentam atividade enzimática intermediária e 1 em cada 300 indivíduos

herda a deficiência da atividade da TPMT (WEINSHILBOUM & SLADEK, 1980; LENNARD *et al.*, 1990; McLEOD *et al.*, 1994; GISBERT *et al.*, 2007).

HONCHEL e colaboradores (1993) realizaram clonagem do DNA complementar (cDNA) ao RNA mensageiro (RNAm) da TPMT em células de carcinoma de cólon (T84). Esses pesquisadores realizaram também a purificação e proteólise da enzima com o objetivo de obter a seqüência de aminoácidos codificados. Descobriram, então, que o gene da enzima possui uma janela de leitura de 735 nucleotídeos, que codifica 245 aminoácidos, e que a proteína expressa tem uma massa molecular de 35kDa.

O gene humano *TPMT* possui, segundo SZUMLANSKI e colaboradores (1996), aproximadamente 34Kb consistindo de 10 exons e 9 introns, localizados no cromossomo 6p22.3. Entretanto KRYNETSKI e colaboradores (1997) sequenciaram o gene e obtiveram um tamanho de 25Kb, com 10 exons e 9 introns.

Até o momento, 25 variantes alélicas da TPMT foram identificadas (Tabela 1). O alelo selvagem (*wild type*) foi designado *TPMT*1* (SZUMLANSKI *et al.*, 1996). A maioria das mutações são polimorfismo de um único nucleotídeo (*single nucleotide polymorphism* – SNP).

Tabela 1- Alelos da Tiopurina Metiltransferase (TPMT) e fenótipo de atividade da TPMT em eritrócitos (adaptado de SALAVAGGIONE *et al.*, 2005).

Alelo TPMT	Mudança de nucleotídeo	Mudança de aminoácido	Atividade da TPMT	Referência
*1	-	-	Alta	SZUMLANSKI <i>et al.</i> , 1996
*2	G238C	Ala80Pro	Baixa	KRYNETSKI <i>et al.</i> , 1995
*3A	G460A/A719G	Ala154Tre e Tir240Cis	Baixa	SZUMLANSKI <i>et al.</i> , 1996
*3B	G460A	Ala154Tre	Baixa	OTTERNESS <i>et al.</i> , 1997
*3C	A719G	Tir240Cis	Baixa	OTTERNESS <i>et al.</i> , 1997
*3D	G292T/G460A/A719G	Glu98STOP/Ala154Tri/Tir240Cis	Intermediária	OTTERNESS <i>et al.</i> , 1997
*4	G19(-1)A	-	Baixa	OTTERNESS <i>et al.</i> , 1998
*5	T146C	Leu49Ser	Intermediária	OTTERNESS <i>et al.</i> , 1997
*6	A539T	Tir180Fen	Baixa	OTTERNESS <i>et al.</i> , 1997
*7	T681G	His227Gln	Intermediária	De La MOUREYERE <i>et al.</i> , 1998a
*8	G644A	Arg215His	Intermediária	HON <i>et al.</i> , 1999
*9	A356C	Lis119Tri	-	WEINSHILBOUM <i>et al.</i> , personal communication in SALAVAGGIONE <i>et al.</i> , 2005
*10	G430C	Gli144Arg	-	COLOMBEL <i>et al.</i> , 2000
*11	G395A	Cis132Tir	Baixa	SCHAEFFELER <i>et al.</i> , 2003
*12	C374T	Ser125Leu	-	HAMDAN-KHALIL <i>et al.</i> , 2003

*13	A83T	Glu28Val	-	HAMDAN-KHALIL <i>et al.</i> , 2003
*14	A1G	Met1Val	Baixa	LINDQVIST <i>et al.</i> , 2004
*15	Perda dos nucleotídeos 419-494 (exon 7)	Perda dos aminoácidos de 140 a 165	Baixa	LINDQVIST <i>et al.</i> , 2004
*16	G488A	Arg163His	Intermediária	SCHAEFFELER <i>et al.</i> , 2004
*17	C142G	Gln42Glu	Intermediária	SCHAEFFELER <i>et al.</i> , 2004
*18	C1211A	Gli71Arg	Intermediária	SCHAEFFELER <i>et al.</i> , 2004
*19	A365TC	Lis122Tri	Alta	HAMDAN-KHALIL <i>et al.</i> , 2005
*20	A712G	Lis238Gli	Intermediária	SCHAEFFELER <i>et al.</i> , 2006
*20	G160A	Gli36Ser	-	SASAKI <i>et al.</i> , 2006
*21	C205G	Leu69val	Intermediária	SCHAEFFELER <i>et al.</i> , 2006
*22	G488C	Arg163Pro	Intermediária	SCHAEFFELER <i>et al.</i> , 2006

O primeiro alelo polimórfico da TPMT foi identificado por KRYNETSKI e colaboradores (1995) e foi chamado *TPMT**2. A perda da atividade da enzima é resultado da mudança de um único nucleotídeo, G para C, na posição 238 do gene, que leva a uma substituição de uma alanina por uma prolina no códon 80. A expressão do cDNA carregando a mutação em um sistema de levedura demonstrou uma redução de 100 vezes na atividade enzimática em relação ao alelo selvagem, apesar de níveis normais de RNAm.

SZUMLANSKI e colaboradores (1996) realizaram a clonagem molecular e a caracterização estrutural do gene *TPMT*. Foram avaliadas amostras de DNA de quatro indivíduos com baixa atividade da TPMT e quatro com alta atividade desta enzima. Através de sequenciamento do DNA, foram descobertos três novos variantes alélicas *TPMT**3A, *3B e *3C, que alteram a seqüência de aminoácidos codificados. A expressão destas

enzimas em células COS-1 e leveduras demonstrou um decréscimo da atividade da enzima TPMT (SZUMLANSKI *et al.*, 1996; TAI *et al.*, 1997).

A variante alélica *TPMT* *3A possui dois SNPs que resultam em alterações nos aminoácidos codificados. No códon 154 do gene, uma Alanina muda para Treonina e no códon 240 uma Tirosina muda para Cisteína. O *TPMT**3C inclui somente uma mutação no códon 240 do gene. O alelo raro *TPMT**3B inclui somente uma mutação no códon 154 do gene (SZUMLANSKI *et al.*, 1996).

A identificação dos demais alelos foi obtida através do sequenciamento do gene *TPMT* em indivíduos com atividade enzimática baixa ou intermediária, ou que apresentavam alterações laboratoriais secundárias, tipo a mielotoxicidade acentuada, nos quais não havia sido identificado nenhum dos alelos mutantes já descritos.

Na Tabela 1 estão relacionados os 25 alelos e os respectivos fenótipos de atividade da TPMT.

Ainda não está definido de que maneira a alteração de um ou dois dos 245 aminoácidos faz com que a atividade da enzima TPMT torne-se intermediária ou baixa. Alguns mecanismos parecem contribuir para essa variação, tais como estabilidade diminuída do RNAm, uma diminuição da síntese protéica ou degradação protéica acelerada (WEINSHILBOUM & WANG, 2004). Em geral, as variantes alélicas da TPMT com grandes alterações na atividade enzimática possuem grandes diferenças nas propriedades químicas dos aminoácidos envolvidos. Além disso, há uma mudança na estrutura da proteína que pode alterar o seu funcionamento (SALAVAGGIONE *et al.*, 2005; WU *et al.*, 2007).

Alguns estudos indicam que a degradação acelerada da TPMT parece ser a principal causa da perda da atividade enzimática. Experimentos conduzidos com o objetivo de testar o tempo de degradação da proteína revelaram tempo significativamente menor para as enzimas codificadas pelo gene *TPMT* com mutação em relação à proteína normal codificada pelo gene sem mutação (TAI *et al.*, 1997; SALAVAGGIONE *et al.*, 2005).

Foi demonstrado também que chaperonas (proteínas que impedem a má formação, agregação ou a precipitação das proteínas) estariam mais associadas com a enzima codificada por gene com mutação do que com a normal. Essa associação traria

conseqüências funcionais para a ubiquitinação (marcação das proteínas para degradação) e degradação da enzima (WANG *et al.*, 2003; WANG & WEINSHILBOUM, 2006).

Alguns estudos sugerem que o polimorfismo no número de repetições em tandem (VNTR) na região não codificante do gene *TPMT* poderia influenciar a atividade dessa enzima. Entretanto, ainda não existe consenso sobre a influência desse polimorfismo na atividade da TPMT (DE LA MOUREYERE *et al.*, 1998a e 1999; SEKI *et al.*, 2000; YAN *et al.*, 2000; ALVES *et al.*, 2001; MARINAKI *et al.*, 2003).

1.3.1- POLIMORFISMO GENÉTICO DA TPMT EM DIFERENTES POPULAÇÕES

O polimorfismo genético da TPMT é evidente em todas as populações estudadas, incluindo caucasianos, asiáticos, afro-americanos e africanos (Tabela 2). Nessas populações, a freqüência de indivíduos sem mutação no alelo *TPMT* (WT/WT) variou de 85,9% (caucasianos ingleses) a 99,2% (japoneses), a de indivíduos com um alelo mutado (WT/MUT) variou de 0,8% (japoneses) a 13,6% (caucasianos franceses) e com os dois alelos mutados (MUT/MUT) de 0% (kenianos, chineses e japoneses) a 0,98% (brasileira) (Tabela 3).

A freqüência e o padrão dos alelos mutantes diferem de acordo com a etnia (McLEOD *et al.*, 2000). Os alelos mutantes mais prevalentes são *TPMT**2, *3A e *3C, compreendendo 80% a 95% dos alelos mutantes encontrados em caucasianos, asiáticos, afro-americanos e africanos (OTTERNESS *et al.*, 1997, YATES *et al.*, 1997; SCHAEFFELER *et al.*, 2003; EICHELBAUM *et al.*, 2006; SCHAEFFELER *et al.*, 2006). O *TPMT**3A é o mais prevalente dos três alelos entre os caucasianos (OTTERNESS *et al.*, 1997; YATES *et al.*, 1997; De La MOUREYERE *et al.*, 1998b; HON *et al.*, 1999; COLLIE-DUGUID *et al.*, 1999; McLEOD *et al.*, 1999; GANIERE-MANTEIL *et al.*, 2004; SCHAEFFELER *et al.*, 2004; GANIERE-MONTEIL *et al.*, 2004; SCHAEFFELER *et al.*, 2006; EICHELBAUM *et al.*, 2006; COROMINAS *et al.*, 2006).

Tabela 2 - Frequência dos alelos da *TPMT* em diferentes populações.

População	Número de alelos	<i>TPMT</i> *1 %	<i>TPMT</i> *2 %	<i>TPMT</i> *3A %	<i>TPMT</i> *3C %	Referência
Caucasiana francesa	382	92,7	0,5	5,7	0,8	De La MOUREYERE <i>et al.</i> , 1998b
Keniana	202	94,6	0	0	5,4	McLEOD <i>et al.</i> , 1999
Caucasiana inglesa	398	94,7	0,5	4,5	0,3	McLEOD <i>et al.</i> , 1999
Caucasiana Americana	*	96,27	0,2	3,2	0,2	HON <i>et al.</i> , 1999
Afro-Americana	*	95,36	0,4	0,8	2,4	HON <i>et al.</i> , 1999
Sudoeste Asiático	198	99	0	1	0	COLLIE-DUGUID <i>et al.</i> , 1999
Chinesa	384	97,7	0	0	2,3	COLLIE-DUGUID <i>et al.</i> , 1999
Caucasiana Inglesa	398	94,5	0,5	4,5	0,50	COLLIE-DUGUID <i>et al.</i> , 1999
Japonesa	384	99,2	0	0	0,8	HIRATSUKA <i>et al.</i> , 2000
Brasileira	404	95,1	2,2	1,5	1	BOSON <i>et al.</i> , 2003
Caucasiana Francesa	936	95,9	0,7	3	0,4	GANIERE-MANTEIL <i>et al.</i> , 2004
Japonesa	484	98,35	0	0	1,65	OKADA <i>et al.</i> , 2005
Tibetanos	100	99	0	0	1	LU <i>et al.</i> , 2005
Boliviana	230	93,48	0	6,52	0	LU <i>et al.</i> , 2005
Chinesa	1402	98,94	0	0,07	0,99	ZHANG <i>et al.</i> , 2006
Espanhola	276	95,29	§	3,26	1,45	COROMIMAS <i>et al.</i> , 2006

* Estimativa de frequência alélica estudada por análise de Coorte. Genotipagem realizada em pacientes nos quais havia sido detectada previamente atividade intermediária ou baixa da *TPMT*.

Genotipagem realizada em 1 paciente com baixa atividade *TPMT*, 30 com atividade intermediária e 43 com alta atividade desta enzima.

§ - neste estudo a frequência alélica do *TPMT**2 não foi avaliada

Tabela 3 - Genótipo da TPMT em diferentes populações.

População	Número de pacientes	WT/WT %	WT/MUT %	MUT/MUT %	Referência
Caucasiana francesa	191	85,9	13,6	0,5	De La MOUREYERE <i>et al.</i> , 1998b
Keniana	101	89,1	10,9	0	McLEOD <i>et al.</i> , 1999
Caucasiana inglesa	199	89,9	9,6	0,5	McLEOD <i>et al.</i> , 1999
Sudoeste Asiático	99	98	2		COLLIE-DUGUID <i>et al.</i> , 1999
Chinesa	192	95,3	4,7	0	COLLIE-DUGUID <i>et al.</i> , 1999
Caucasiana Inglesa	199	89,9	9,6	0	COLLIE-DUGUID <i>et al.</i> , 1999
Japonesa	192	99,2	0,8	0	HIRATSUKA <i>et al.</i> , 2000
Brasileira	202	90,2	8,8	0,98	BOSON <i>et al.</i> , 2003
Caucasiana Francesa	468	91,9	7,9	0,2	GANIERE- MANTEIL <i>et al.</i> , 2004
Japonesa	242	96,7	3,3	0	OKADA <i>et al.</i> , 2005
Tibetanos	50	98	2	0	LU <i>et al.</i> , 2005
Boliviana	115	86,96	13,04	0	LU <i>et al.</i> , 2005
Chinesa	701	97,9	2,13	0	ZHANG <i>et al.</i> , 2006
Espanhola	138	89,1	9,42	1,44	COROMINAS <i>et al.</i> , 2006

WT/WT homocigoto para o alelo selvagem *TPMT* (*wild type*); WT/MUT heterocigoto para alguma das mutações (*TPMT*2*, *TPMT*3A* ou *TPMT*3C*); MUT/MUT homocigoto para alguma das mutações estudadas.

Na literatura consultada foram encontrados apenas dois estudos envolvendo a população brasileira.

Pesquisadores de Minas Gerais determinaram a frequência de seis variantes alélicas do gene da TPMT em uma população de 202 indivíduos, com idade superior a 18 anos, que foram atendidos no Hospital das Clínicas - UFMG. A frequência alélica foi 2,2%, 1,5%, 0,2% e 1%, para os alelos *TPMT*2*, *TPMT*3A*, **3B* e **3C*, respectivamente. Nesta população brasileira não foram detectados os alelos *TPMT*5* e **6* (BOSON *et al.*, 2003).

Em outro estudo, REIS e colaboradores (2003) estudaram o polimorfismo da TPMT em 306 indivíduos saudáveis. Os participantes foram classificados, de acordo com o auto-relato, em euro-descendentes (n = 83), afro-descendentes (n = 18) ou miscigenados (n = 204). O único paciente que declarou ser descendente de árabes foi excluído da análise. A atividade enzimática foi avaliada em todos os participantes por meio de ensaio radioquímico, e o genótipo, através da reação em cadeia da polimerase (PCR), em 74 indivíduos. No grupo de afro-descendentes não foram detectadas alelos mutantes. Para os euro-descendentes, a frequência dos alelos *TPMT*2*, *TPMT*3A* e *TPMT*3C* foi de 0,76%, 2,03% e 2,54%, respectivamente e de 0,60%, 1,81% e 1,81% para os que declararam ser miscigenados. Não foram identificados alelos mutantes no grupo de pacientes com alta atividade enzimática. No grupo de 30 indivíduos com fenótipo intermediário, 26 apresentavam um alelo mutante. A presença de baixa atividade enzimática foi identificada em um indivíduo e estava associada à presença de dois alelos mutantes (genótipo *TPMT*3A/*3C*).

1.3.2- MÉTODOS PARA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA TPMT

O acúmulo celular de metabólitos ativos (6-TGN) está inversamente relacionado com a atividade da TPMT (RELLING *et al.*, 1999a). Determinações da atividade da TPMT em eritrócitos ou a determinação do genótipo através de estudos do DNA, antes do início do tratamento com tiopurinas, têm sido sugeridas como uma forma de se minimizar a toxicidade desses medicamentos, obtendo-se melhor resultado terapêutico (ANDERSEN *et al.*, 1998; BROUWER *et al.*, 2005).

A fenotipagem consiste em determinar a atividade enzimática em eritrócitos através de experimentos radioquímicos (KRYNETSKI *et al.*, 1995; SZUMLANSKI *et al.*, 1996; OTTERNESS *et al.*, 1997; DE LA MOUREYRE *et al.*, 1998b; OTTERNESS *et al.*, 1998; HAMDAN-KHALIL *et al.*, 2003) ou cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (SCHAEFFELER *et al.*, 2001; SCHAEFFELER *et al.*, 2003; SCHAFFELER *et al.*, 2004; HAMDAN-KHALIL *et al.*, 2005).

Existe uma forte correlação entre a atividade da TPMT nos eritrócitos e sua atividade em outras células e tecidos, incluindo os blastos leucêmicos, fígado e rins (McLEOD *et al.*, 1995; COULTHARD *et al.*, 1998).

Existem limitações importantes no que diz respeito à fenotipagem da TPMT. A determinação da atividade enzimática pode não ser confiável em indivíduos que receberam transfusão de hemácias 30 a 60 dias antes da avaliação e que fazem uso de drogas, como a sulfasalazina (YATES *et al.*, 1997; RELING *et al.*, 1999b; SCHAEFFELER *et al.*, 2001).

Fatores como o estágio da doença, uso de medicamentos e fatores ambientais podem ser moduladores da atividade da TPMT, podendo contribuir para uma classificação equivocada do fenótipo (DE LA MOUREYRE *et al.*, 1998b).

Pesquisadores ingleses observaram que a administração de tiopurinas, por si mesma, poderia alterar a atividade da TPMT nos eritrócitos, “induzindo” um aumento médio de 30% na atividade enzimática (McLEOD, 1995; LENNARD *et al.*, 1990). Essa atividade apresentaria diminuição proporcional após a interrupção da quimioterapia (LENNARD *et al.*, 1993). Desta forma, falhas na adesão também poderiam ser causa de “diminuição” da atividade enzimática durante o tratamento (McLEOD, 1995).

Pesquisadores holandeses, em estudo no qual foi realizada a fenotipagem e a genotipagem em 173 pacientes com LLA e 122 controles, observaram que a atividade da TPMT nos pacientes no momento do diagnóstico era significativamente mais baixa do que nos controles. Essa redução não estava associada com diferenças na frequência de mutações nos dois grupos. Foi observado um aumento no nível de atividade da TPMT em várias fases do tratamento (após indução, após uso de MTX, no início e durante a fase de manutenção), em comparação com o nível de atividade no mesmo paciente ao diagnóstico. Esses achados demonstram que a atividade da TPMT pode estar aumentada mesmo antes do uso da 6-MP.

Experimentos *in vitro* indicaram que este aumento poderia estar associado ao uso de antifolatos durante a fase de indução do tratamento, ou seja, MTX intratecal e Trimetoprim (BROUWER *et al.*, 2005).

Os pesquisadores avaliaram também a influência da transfusão de hemácias na avaliação da atividade da TPMT. No grupo de pacientes portadores do alelo selvagem não foi observada interferência das transfusões de hemácias na média de atividade da TPMT. Entretanto, os autores consideram que pacientes portadores de deficiência da TPMT poderiam ter essa deficiência mascarada, caso recebessem transfusão de hemácias de um doador com alta atividade enzimática (BROUWER *et al.*, 2005).

YATES e colaboradores (1997) descreveram um paciente com genótipo homozigoto *TPMT*3A/TPMT*3A* que apresentou atividade enzimática intermediária da TPMT 12 dias após ter recebido transfusão de eritrócitos e, quatro meses após esta transfusão, não apresentou níveis detectáveis da enzima.

A genotipagem é baseada na análise do DNA e tem como objetivo a identificação de eventuais mutações no gene da TPMT. Esta análise pode ser feita através de PCR para verificar polimorfismo do comprimento do fragmento de restrição (PCR-RFLP) (HON *et al.*, 1999; OTTERNESS *et al.*, 1997 e 1998; ROBERTS *et al.*, 2004), polimorfismo de conformação de fita única (PCR-SSCP) (DE LA MOUREYRE *et al.*, 1998a; DE LA MOUREYRE *et al.*, 1998b; COLOMBEL *et al.*, 2000; HAMDAN-KHALIL *et al.*, 2003), sistema de amplificação refratário a mutação (PCR-ARMS) (ROBERTS *et al.*, 2004), cromatografia líquida desnaturante de alta eficiência (DHPLC) (SCHAEFFELER *et al.*, 2001, 2003 e 2004; SASAKI *et al.*, 2006), ou sequenciamento (SZUMLANSKI *et al.*, 1996; OTTERNESS *et al.*, 1997; HAMDAN-KHALIL *et al.*, 2005).

YATES e colaboradores (1997) utilizaram a PCR como método para a genotipagem e encontraram uma concordância entre genótipo e fenótipo de 100% nos pacientes com baixa e alta atividade enzimática TPMT e 95,2% nos pacientes com atividade intermediária. SCHAEFFELER e colaboradores (2004) estudaram o genótipo de indivíduos com o método DHPLC e concluíram que a genotipagem é altamente sensível (90%) e específica (99%) na identificação de pacientes que apresentam um ou dois alelos *TPMT* mutados. Eles

encontraram uma concordância entre fenótipo e genótipo de aproximadamente 98%. Portanto, a genotipagem é um método eficaz para prever o nível de atividade da TPMT.

A principal limitação para o uso da genotipagem é que, atualmente, existem 25 alelos polimórficos descritos (SALAVAGGIONE *et al.*, 2005; SCHAEFFELER *et al.*, 2006; SASAKI *et al.*, 2006). No entanto, deve ser ressaltado que os alelos mutantes *TPMT**2, *3A e *3C compreendem 80 a 95% dos alelos mutantes encontrados em caucasianos, asiáticos, afro-americanos e africanos. Utilizando-se tecnologias que permitam a identificação desses alelos mais frequentes, as análises genóticas podem prever com sucesso o nível de atividade da TPMT em aproximadamente 95% dos pacientes. (EICHELBAUM *et al.*, 2006).

A relação entre fenótipo e genótipo está definida para a maioria dos alelos da *TPMT* (KRYNETSKI *et al.*, 1995; SZUMLANSKI *et al.*, 1996; YATES *et al.*, 1997; OTTERNESS *et al.*, 1997; OTTERNESS *et al.*, 1998; DE LA MOUREYERE *et al.*, 1998a; HON *et al.*, 1999; SCHAEFFELER *et al.*, 2003; LINDQVIST *et al.*, 2004; SCHAEFFELER *et al.*, 2004; HAMDAN-KHALIL *et al.*, 2005; SCHAEFFELER *et al.*, 2006). A presença dos genótipos *TPMT**2, *3A, *3C prediz o fenótipo (**Figura 3**). Os pacientes heterozigotos para estes alelos apresentam atividade enzimática intermediária e os indivíduos homozigotos apresentam deficiência da TPMT (KRYNETSKI *et al.*, 1995; SZUMLANSKI *et al.*, 1996; YATES *et al.*, 1997; OTTERNESS *et al.*, 1997; COULTHARD *et al.*, 2000; SCHAEFFELER *et al.*, 2001; SCHAEFFELER *et al.*, 2004). Como seria esperado, o heterozigoto composto (*TPMT**2/*3A, *TPMT**3A/*3C) apresenta atividade enzimática baixa.

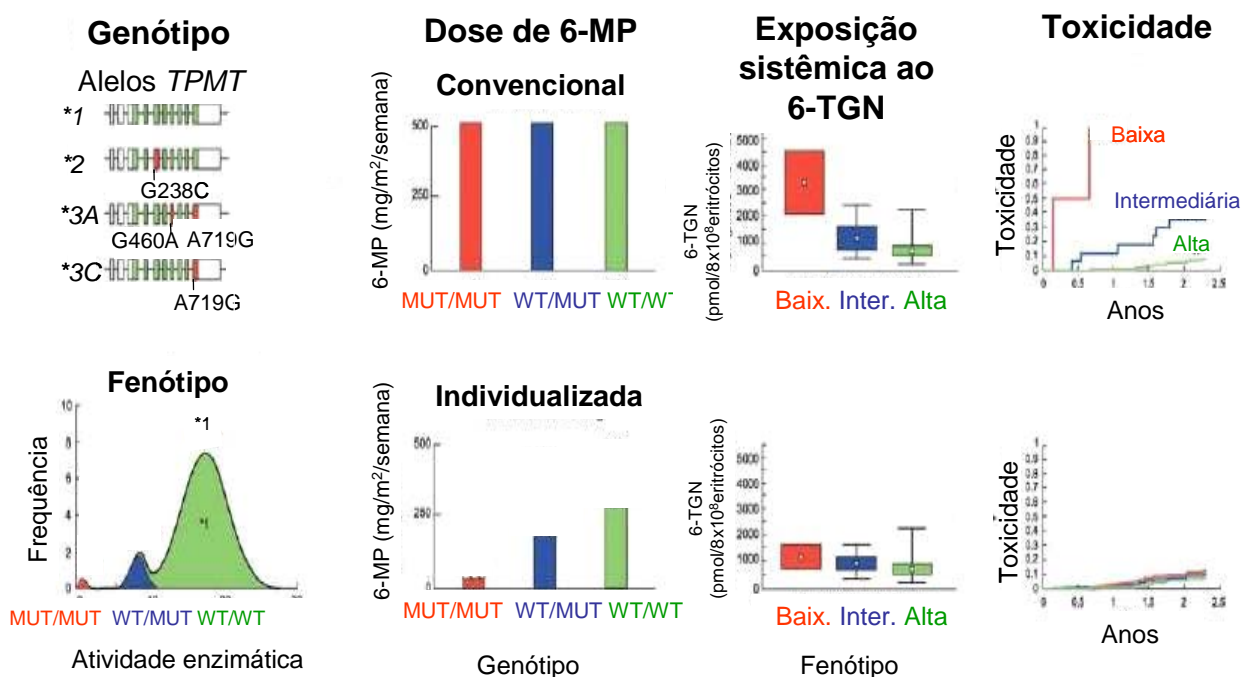


Figura 3 - Polimorfismo genético da *TPMT* e sua relação com a resposta a drogas tiopurinas. O primeiro painel à esquerda, na parte de cima, ilustra os alelos da *TPMT* mais frequentes nas populações; na parte de baixo, a frequência de atividade enzimática da *TPMT* nos diferentes genótipos. O segundo painel ilustra a dose de 6-MP prescrita de maneira convencional (topo do painel) e ajustada (individualizada) de acordo com o genótipo (painel inferior). O terceiro painel ilustra a exposição sistêmica ao metabólito ativo os nucleotídeos da 6-TGN em pacientes com atividade *TPMT* baixa, intermediária e alta expostos a doses convencionais (painel superior) e individualizadas (painel inferior). O quarto painel ilustra a diferença de toxicidade alcançada em pacientes com atividade *TPMT* baixa, intermediária e alta quando as doses convencionais de 6-MP são administradas (gráfico superior) e quando as dose são ajustadas pelo genótipo (gráfico inferior). MUT/MUT = pacientes homocigotos para a mutação; WT/MUT = pacientes heterocigotos para a mutação; WT/WT = pacientes normais para o gene *TPMT*; 6-MP = 6 Mercaptopurina; 6-TGN nucleotídeos da 6-Tioguanina (adaptado de EICHELBAUM *et al.*, 2006).

Há uma grande variabilidade na atividade da TPMT observada em homozigotos para o gene selvagem e no grupo de pacientes heterozigotos, sugerindo que o polimorfismo não é o único fator regulador da atividade enzimática (McLEOD *et al.*, 2000).

SALAVAGGIONE e colaboradores (2005) investigaram os efeitos funcionais das variantes alélicas *TPMT**2, *3A, *3B, *3C e *5 a *13 em humanos. Os pesquisadores verificaram que as enzimas codificadas por esses alelos apresentavam níveis de atividade que variavam de praticamente indetectável (*3A, *3B e *5) a 98% (*7) da atividade observada para a proteína codificada pelo alelo *TPMT* *1 (*wild type*). Os níveis de atividade da enzima produzida pelos alelos *TPMT**2, *3C, e *12 eram inferiores a 50% quando comparados com a produzida pelo alelo selvagem (*TPMT* *1). As variantes alélicas *TPMT* *7, *8 e *9, foram as únicas que não apresentaram redução significativa da atividade enzimática em relação à proteína normal.

Pacientes heterozigotos para os alelos *TPMT**3A, (DE LA MOUREYERE *et al.*, 1998b) *9, (SCHAEFFELER *et al.*, 2004) e *19 (HAMDAN-KHALIL *et al.*, 2005) podem apresentar atividade enzimática comparável à da proteína produzida pelo alelo selvagem.

SCHAEFFELER e colaboradores (2004) analisaram a influência do gênero, idade e uso de nicotina na atividade da TPMT. Os pesquisadores verificaram que os homens possuem uma atividade enzimática 7% maior que as mulheres. A idade, variando de 18 a 65 anos, não interferiu na atividade enzimática. Quanto ao uso de nicotina, homens e mulheres fumantes apresentaram níveis significativamente mais altos de TPMT em relação aos não fumantes. A cafeína não alterou significativamente a atividade dessa enzima para ambos os gêneros.

GANIÈRE-MONTEIL e colaboradores (2004) observaram que a atividade enzimática foi significativamente menor em crianças quando comparadas com adultos ($p=0,033$). Não houve diferença significativa quando foram comparados recém-nascidos (material de cordão umbilical) com crianças de outras faixas etárias (idade $5,7 \pm 4,2$ anos).

1.3.3- O POLIMORFISMO GENÉTICO DA TPMT E SUA IMPORTÂNCIA CLÍNICA PARA AS CRIANÇAS COM LLA

Pesquisadores americanos estudaram o metabolismo e a tolerância à 6-MP em pacientes com LLA com diferentes fenótipos da atividade da TPMT. As concentrações intra-eritrocitárias dos 6-TGN apresentaram, como seria esperado, uma correlação inversa com a atividade da TPMT. Os pacientes homocigotos para os alelos mutantes do gene TPMT toleraram a dose plena da 6-MP (75 mg/m²/dia) em apenas 7% das semanas, os heterocigotos em 65% das semanas e os pacientes com alta atividade enzimática em 84% das semanas durante dois anos e meio de tratamento. A média final (\pm desvio padrão) de doses semanais de 6-MP foi de 72 (\pm 60), 449 (\pm 160) e 528 (\pm 90) mg/m², para cada um daqueles grupos, respectivamente. Esses resultados indicam que o polimorfismo genético da TPMT tem grande influência na tolerância aos regimes terapêuticos que contêm 6-MP ou outras tiopurinas (RELLING *et al.*, 1999a).

Pacientes com alta atividade da enzima TPMT podem apresentar um maior risco de falha terapêutica, uma vez que a alta atividade da TPMT resulta em maior inativação das tiopurinas e menor exposição das células leucêmicas aos metabólitos ativos (6-TGN). Esses pacientes podem se beneficiar de doses mais altas de tiopurinas (LENNARD *et al.*, 1990; LILLEYMAN & LENNARD, 1994; CHEOK & EVANS, 2006).

Por sua vez, pacientes portadores da deficiência da TPMT são mais expostos aos metabólitos ativos da 6-MP e apresentam concentrações intracelulares de 6-TGN superiores às observadas nos indivíduos com alta atividade enzimática. Esse acúmulo, que ocorre principalmente nos tecidos hematopoiéticos, predispõe a quadros graves de mielotoxicidade durante tratamento com doses habituais de tiopurinas. Estudos mais recentes indicam que os pacientes com atividade enzimática intermediária também apresentam grande risco de desenvolvimento de toxicidade secundária ao uso dessas drogas (RELLING *et al.*, 1999a; CHEOK & EVANS, 2006).

Durante a fase de manutenção da quimioterapia em pacientes com LLA, as doses de 6-MP e MTX são inicialmente prescritas com base na área de superfície corporal e, subsequentemente, ajustadas de acordo com a toxicidade alcançada (POPLACK *et al.*, 1986; GIVERHAUG *et al.*, 1999). O ajuste dessas para atingir um determinado ponto de

leucopenia ou neutropenia tem sido o procedimento habitual durante a fase de manutenção do tratamento da LLA por várias décadas. Porém, só recentemente tem sido demonstrada a importância clínica desta prática. A maioria dos protocolos de tratamento recomenda que a contagem de leucócitos seja mantida entre 2.000 e 4.000/mm³ (ARICÓ *et al.*, 2005). Porém não se sabe se este seria o intervalo ideal. (SCHMIEGELOW & PULCZYNSKA,1990b).

Existem evidências de que a contagem de leucócitos seria uma forma indireta de se avaliar a intensidade da quimioterapia. Contagens elevadas de leucócitos estariam associadas a menor exposição a concentrações adequadas de 6-MP e/ou MTX durante a fase de manutenção da quimioterapia (CHESSELS, 2000). A presença de leucopenia “controlada”, no limite de tolerabilidade clínica, poderia contribuir para um melhor prognóstico destes pacientes (SCHMIEGELOW & PULCZYNSKA,1990b). Portanto, pacientes com contagens de leucócitos elevadas apresentariam um risco de recidiva significativamente maior (SCHMIEGELOW & PULCZYNSKA 1990a).

As crianças com baixa atividade da TPMT necessitam de ajuste freqüente das doses de 6-MP, enquanto que as com níveis mais altos apresentavam uma tendência para tolerar longos períodos com dose completa de 6-MP, sem o aparecimento de neutropenia. A falha na atividade citotóxica da droga, representada pela ausência de leucopenia e/ou neutropenia, pode significar sub-tratamento, permitindo que células residuais sobrevivam e reapareçam (LENNARD *et al.*, 1990; PEARSON *et al.*,1991). Esses dados reforçam a hipótese de que nem sempre a dose prescrita é a dose máxima tolerada pelos indivíduos. Portanto, o estudo do perfil da atividade da TPMT pode ser uma ferramenta auxiliar para o ajuste das doses da 6-MP em pacientes com LLA.

As crianças com LLA portadoras de deficiência da TPMT podem ser tratadas com sucesso utilizando apenas 10% a 20% das doses convencionais de 6-MP. Nos pacientes heterozigotos as doses podem ser reduzidas em até 35% a 50%, ou seja, nesses casos as reduções podem ser mais moderadas (CHEOK and EVANS, 2006).

Como o efeito citotóxico da 6-MP não está baseado apenas na formação de 6-TGN, alguns pesquisadores observaram ausência de relação entre a dose de 6-MP e a concentração de 6-TGN, sugerindo que as modificações nas doses de 6-MP não acarretam alterações previsíveis e proporcionais na concentração intra-eritrocitária destes metabólitos.

Esses pesquisadores consideraram, também, que é difícil estabelecer uma relação entre a evolução do paciente e parâmetros farmacocinéticos de uma única droga, quando se emprega um esquema de quimioterapia que inclui múltiplos agentes, como nos utilizados para o tratamento da LLA (SCHMIEGELOW *et al.*, 1995; BALIS *et al.*, 1998).

Portanto, análise isolada da concentração intra-eritrocitária dos 6-TGN pode ser inadequada para a otimização do tratamento em alguns pacientes com LLA. O uso concomitante destas concentrações e da contagem de leucócitos para monitoramento do tratamento parece ser um procedimento mais adequado (INNOCENTI *et al.*, 2000).

RELLING e colaboradores (1999b), pesquisadores do *St. Jude Children's Research Hospital*, avaliaram a importância prognóstica dos metabólitos ativos da 6-MP (6-TGN) e do MTX (poliglutamatos do metotrexato – MTXPGs) e da intensidade das doses destes medicamentos administradas na fase de manutenção do tratamento. Na análise univariada, os únicos fatores associados à sobrevida livre de doença foram a intensidade da dose de 6-MP e a intensidade da dose de MTX. Na análise multivariada apenas a intensidade da dose de 6-MP manteve seu significado prognóstico para a sobrevida livre de evento ($p = 0,022$), mostrando que os pacientes que receberam doses de 6-MP com maior intensidade apresentavam maior probabilidade de sobrevida, quando comparados com os demais. A mediana da dose acumulada de 6-MP foi maior no grupo de pacientes com alta atividade da enzima TPMT do que no grupo de pacientes com deficiência na atividade desta enzima (homozigotos e heterozigotos). A introdução do perfil enzimático na análise multivariada não modificou a importância prognóstica da intensidade da dose de 6-MP. O principal motivo para a diminuição da intensidade da dose cumulativa de 6-MP foram as interrupções durante semanas inteiras de quimioterapia e não a redução de doses diárias de 6-MP. Na maioria das vezes, estas interrupções estavam relacionadas a episódios de neutropenia. Foi observada uma tendência de associação entre neutropenia e prognóstico desfavorável ($p = 0,04$). Os autores observaram que a concentração intra-eritrocitária dos 6-TGN não apresentou significado prognóstico e apresentaram diversas hipóteses para explicar esse resultado. Entre elas, chama atenção o fato de que a avaliação da intensidade da dose de 6-MP provavelmente fornece uma avaliação mais global, já que avalia todas as semanas da fase de manutenção do tratamento. Por sua vez, a dosagem de 6-TGN é feita apenas em algumas semanas específicas. A eficácia da 6-MP parece ser dependente de uma

exposição crônica adequada a essa droga, durante o maior número possível de semanas ininterruptas durante a fase de manutenção do tratamento. Os resultados deste estudo reforçam a necessidade do uso de doses máximas de 6-MP, principalmente nos indivíduos com alta atividade da enzima TPMT, evitando-se, contudo, que a toxicidade seja tão intensa que leve a interrupções prolongadas da quimioterapia, comprometendo a intensidade da dose total e, conseqüentemente, o prognóstico dos pacientes.

Em estudo recente, no qual a dose da 6-MP era individualizada de acordo com a atividade da TPMT, o genótipo da TPMT não teve influência prognóstica. Os pesquisadores consideraram que a administração constante da 6-MP, ou seja, evitando-se ao máximo as interrupções, resultaria em menores índices de recidiva. Portanto, a meta neste estudo era manter a mais alta dose diária de 6-MP tolerada pelo paciente. Utilizando esta abordagem, o genótipo *TPMT* não foi preditivo do risco de recidiva hematológica (ROCHA *et al.*, 2005; RELLING *et al.*, 2006).

Outros estudos também demonstraram que o risco de recidiva estava relacionado com o tempo de interrupção da quimioterapia. Pacientes que tiveram períodos prolongados de interrupção da quimioterapia apresentaram evolução clínica desfavorável. No entanto, é importante ressaltar que, pode não ser adequada apenas a manutenção do paciente em quimioterapia ininterrupta, com as doses recomendadas pelos protocolos, pois corre-se o risco de mantê-los com exposição insuficiente às drogas (SCHMIEGELOW, 1991; VIANA *et al.*, 2001).

Em estudo pioneiro, pesquisadores do grupo alemão BFM avaliaram a associação do genótipo *TPMT* com os níveis de doença residual mínima antes e após fase de indução/consolidação da quimioterapia, na qual a 6-MP era utilizada. Os pacientes portadores de deficiência da TPMT foram tratados com doses reduzidas de 6-MP e, portanto, foram excluídos do estudo. As doses de 6-MP não foram ajustadas previamente para os pacientes heterozigotos. Os pacientes heterozigotos apresentaram índices de doença residual mínima significativamente mais baixos do que os homozigotos para o alelo selvagem (*wild type*). Os autores concluíram que a redução das doses de 6-MP, durante a fase de indução/consolidação, baseada no genótipo da TPMT, seria de pouco benefício para pacientes heterozigotos tratados de acordo com o protocolo do grupo BFM e que os indivíduos com alta atividade enzimática (*wild type*) poderiam se beneficiar com o uso de

doses mais altas de 6-MP. No entanto, a comprovação dessas hipóteses, e da sua influência nos resultados finais do tratamento, demandam um tempo mais longo de acompanhamento (STANULLA *et al.*, 2005).

A relação entre as neoplasias secundárias e a farmacologia da 6-MP é outro aspecto importante relacionado ao polimorfismo da TPMT. Pacientes portadores de deficiência da enzima TPMT parecem apresentar risco aumentado para o desenvolvimento dessas neoplasias, incluindo os tumores de Sistema Nervoso Central após uso de radioterapia, leucemia mielóide aguda e mielodisplasia secundárias (RELLING *et al.*, 1999c; MCLEOD *et al.*, 2000).

Diante do exposto, existem fortes evidências de que a utilização de doses individualizadas, de acordo com a atividade da TPMT, em combinação com a determinação das concentrações dos metabólitos das tiopurinas e com a avaliação da tolerância clínica, pode ser uma estratégia importante para atenuar a toxicidade dessas drogas, sem comprometer a eficácia do tratamento em pacientes com LLA (RELLING *et al.*, 2006).

2- OBJETIVO GERAL

Determinar a frequência das principais variantes alélicas do gene da Tiopurina Metiltransferase (TPMT) em uma população de crianças e adolescentes com Leucemia Linfocítica Aguda (LLA) e correlacioná-la com dados clínicos e laboratoriais obtidos durante a fase de manutenção da quimioterapia.

2.1-OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1- Otimizar a PCR ARMS alelo específica, para cada par de iniciadores separadamente e, posteriormente, agrupá-los em uma PCR *multiplex*.

2- Determinar a frequência dos alelos *TPMT**2, *3A e *3C na população estudada.

3- Verificar a associação entre genótipo e dados clínicos (gênero, tempo de interrupção da quimioterapia, médias das doses de 6-MP e MTX) e laboratoriais (medianas das contagens de leucócitos e neutrófilos) obtidos durante a fase de manutenção da quimioterapia.

4- Correlacionar o genótipo com a concentração intra-eritrocitária dos metabólitos da 6-MP (nucleotídeos da 6-tioguanina, 6-TGN e metilmercaptipurina, MMP).

3- PACIENTES E MÉTODOS

3.1- ASPECTOS ÉTICOS

Este estudo foi aprovado na Câmara do Departamento de Pediatria, no Serviço de Hematologia do Hospital das Clínicas da UFMG (Anexo 1), na Diretoria de Ensino, Pesquisa e Extensão da do Hospital das Clínicas da UFMG (Anexo 2), e no Comitê de Ética em Pesquisa (COEP) da UFMG (Anexo 3). Para a inclusão dos pacientes foi solicitada a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido aos pais ou responsável (Anexo 4).

Os protocolos do Grupo Cooperativo Brasileiro para Tratamento da Leucemia Infantil (GBTLI) prevêem que todos os pacientes admitidos ou seus responsáveis assinem um termo de consentimento onde são esclarecidos sobre o tratamento. Para inclusão dos pacientes no estudo destinado à avaliação da adesão ao tratamento em crianças portadoras de LLA através da dosagem de metabólitos da 6-MP, também, foi solicitada autorização dos pais e responsáveis logo que as crianças iniciaram a fase de manutenção do tratamento. Os dois estudos foram aprovados na Câmara do Departamento de Pediatria e no COEP/UFMG (pareceres 007/97 e 021/01).

3.2- PACIENTES

A população estudada consistiu de crianças e adolescentes com Leucemia Linfocítica Aguda (LLA) admitidas no Hospital das Clínicas da UFMG (HC-UFMG) e submetidas aos protocolos de tratamento do Grupo Cooperativo Brasileiro para Tratamento da Leucemia Infantil – GBTLI LLA - 93 e GBTLI LLA - 99. Foram incluídos nestes protocolos todos os pacientes com LLA, sem tratamento prévio, com idade inferior a 18 anos. Para os fins deste estudo foram considerados apenas aqueles que alcançaram a fase de manutenção do tratamento no período de maio de 1997 a maio de 2005.

Para correlacionar o genótipo com a concentração de metabólitos da 6-MP foi estudado um grupo de 36 crianças admitidas em um estudo anterior, conduzido pela mesma equipe de pesquisadores, no período de 1997 a 2003, no qual foi realizada a dosagem dos

metabólitos da 6-MP (OLIVEIRA *et al.*, 2004c). Para correlacionar o genótipo com dados clínicos e laboratoriais obtidos durante a fase de manutenção, esse grupo foi acrescido de mais 80 crianças, totalizando uma população de 116 pacientes, para os quais foram coletados os dados referentes à contagem de leucócitos e neutrófilos, período de interrupção da quimioterapia e dose de 6-MP e MTX prescrita durante a fase de manutenção do protocolo terapêutico.

A fase de manutenção do tratamento foi escolhida para a avaliação da associação entre genótipo e dados clínicos e laboratoriais, pois está alicerçada no uso de 6-MP e MTX, sendo que a primeira é administrada diariamente, por via oral, durante um período prolongado.

Todos os pacientes foram acompanhados longitudinalmente no Serviço de Hematologia Pediátrica do HC-UFMG, submetendo-se a avaliações clínico-laboratoriais com periodicidade variável de acordo com o protocolo específico de tratamento.

3.3- ESQUEMAS TERAPÊUTICOS

Os esquemas terapêuticos utilizados foram os dos protocolos do Grupo Cooperativo Brasileiro para Tratamento da Leucemia Infantil para a leucemia linfóide aguda na infância (GBTLI LLA - 93 e GBTLI LLA - 99).

Todos os quimioterápicos foram fornecidos pelo Sistema Único de Saúde (SUS) através do serviço de quimioterapia e farmácia da instituição ou através de outros convênios, nos casos em que a fase de manutenção do tratamento foi realizada em consultório particular.

3.3.1- GBTLI LLA - 93

O protocolo do estudo GBTLI LLA - 93 previa a estratificação dos pacientes em três grupos de risco para recidiva, utilizando como critérios: a idade ao diagnóstico, contagem de leucócitos ao diagnóstico, presença de massa mediastinal, comprometimento do sistema nervoso central (SNC), hepato-esplenomegalia, imunofenotipagem e a citogenética, quando realizada.

Os grupos de risco são os seguintes:

1. Risco Básico Verdadeiro (RBV)

Critérios imprescindíveis: pacientes com idade ≥ 1 ano e < 10 anos, com contagem leucocitária inicial $\leq 10.000/\text{mm}^3$, ausência de massa mediastinal, ausência de envolvimento do SNC, hepato e/ou esplenomegalia inferior a cinco centímetros a partir do rebordo costal, medida na linha hemiclavicular.

2. Risco Básico (RB)

Critérios imprescindíveis: pacientes com idade ≥ 1 ano e < 10 anos, com contagem leucocitária inicial acima de $10.000/\text{mm}^3$ e até $50.000/\text{mm}^3$ e/ou presença de massa mediastinal, e/ou fígado ou baço $>$ cinco centímetros a partir do rebordo costal medidos na linha hemiclavicular.

3. Alto Risco (AR)

Critérios imprescindíveis: pacientes com idade inferior a 12 meses e ≥ 10 anos, e/ou com contagem leucocitária inicial acima de $50.000/\text{mm}^3$ e/ou envolvimento do SNC.

Após a obtenção da remissão clínica completa da doença (RCC), os pacientes incluídos no estudo do GBTLI - 93 foram submetidos a um sorteio para definição do tempo de duração da terapia de manutenção e alocados em dois grupos: grupo 1 (terapia de manutenção com duração de um ano e meio) ou grupo 2 (terapia de manutenção com duração de dois anos). Para que os pacientes fossem incluídos no estudo do GBTLI LLA - 93 e submetidos à randomização, foi solicitada aos pais a assinatura do termo de consentimento no início do tratamento.

O planejamento da terapia para o grupo RBV compreendia quatro fases: fase de indução, fase de intensificação e uma re-indução (Anexo 5). A terapia de manutenção deveria ser iniciada na 22^a semana, a partir do início do tratamento e teria duração total de um ano e meio ou dois anos de duração, conforme os critérios citados anteriormente.

A fase de manutenção do tratamento consistia da associação de 6-MP e MTX:

- 6-MP: dose inicial de $50 \text{ mg}/\text{m}^2/\text{dia}$, administrada por via oral, diariamente (dose máxima de $100 \text{ mg}/\text{m}^2/\text{dia}$);
- MTX: dose inicial de $25 \text{ mg}/\text{m}^2/\text{semana}$, administrada por via intramuscular (dose máxima de $40 \text{ mg}/\text{m}^2/\text{semana}$).

As doses de 6-MP e MTX deveriam ser ajustadas de forma a manter a contagem de leucócitos entre 2.000 e 3.000/mm³, com a contagem de fagócitos acima de 500/mm³.

Quando a contagem de fagócitos fosse inferior a 500/mm³, a quimioterapia deveria ser suspensa provisoriamente, até a recuperação dos níveis leucocitários. Após a recuperação, a medicação deveria ser reiniciada com metade da dose anterior, aumentando-se a dose progressivamente em uma a duas semanas.

Se durante a fase de manutenção, dois ou três hemogramas seqüenciais (semanais ou quinzenais), mostrassem contagem de leucócitos acima de 3.500 a 4.000/mm³, as doses de 6-MP e MTX deveriam ser aumentadas em 25%.

O esquema terapêutico para o grupo RB compreendeu as mesmas fases de indução, intensificação e re-indução do RBV (Anexo 5), seguidas da fase de manutenção. Os critérios para ajustes das doses das drogas que alicerçam esta fase do tratamento (6-MP e MTX) foram os mesmos adotados para o grupo RBV. No grupo RB, foram incluídos nesta fase pulsos de vincristina (VCR) e dexametasona (DXM), administrados a cada oito semanas durante o primeiro ano da manutenção (semanas 29, 37, 45, 53, 61, 69 e 77 do tratamento). A VCR deveria ser administrada no primeiro dia do pulso, por via endovenosa, na dose de 1,5 mg/m² (dose máxima de 2 mg) e a DXM deveria ser administrada por via oral, durante sete dias, na dose de 4 mg/m²/dia. O uso de 6-MP e MTX deveria ser mantido durante estes pulsos. A duração da fase de manutenção do tratamento obedeceu aos mesmos critérios definidos para o RBV.

A terapia do grupo AR compreendeu quatro fases: indução com duração de seis semanas, a intensificação igual à do RBV e RB, uma fase de re-indução onde foi incluída a radioterapia crânio-espinal e a seguir a fase de manutenção com duração total de um ano e meio ou dois anos (Anexo 5). A terapia de manutenção compreendia duas fases. Durante o primeiro ano (até a 77^a semana do tratamento) deveria ser realizado rodízio de três blocos de quimioterapia, administrados de maneira seqüencial a cada três semanas. Estes blocos alternavam-se a cada 21 dias, num total de 18 blocos (Anexo 5). Após o primeiro ano de terapia de manutenção, seguiu-se a quimioterapia com 6-MP e MTX, seguindo as mesmas especificações feitas para os outros dois grupos, e pulsos de VCR e DXM, nas mesmas doses utilizadas no grupo de RB, a cada oito semanas até o final do tratamento.

3.3.2- GBTLI LLA - 99

De acordo com o protocolo GBTLI LLA - 99, os pacientes foram classificados em dois grupos. O chamado grupo de baixo risco de recidiva (BR), foi representado pelos pacientes que, ao diagnóstico, tinham idade ≥ 1 ano e < 9 anos e/ou contagem inicial de leucócitos inferior a $50.000/\text{mm}^3$. O outro grupo, chamado de Alto Risco de recidiva (AR) foi constituído pelos doentes que, ao diagnóstico, tinham idade < 1 ano e ≥ 9 anos e/ou contagem inicial de leucócitos $\geq 50.000/\text{mm}^3$.

3.3.2.1- GRUPO DE BAIXO RISCO DE RECIDIVA (BR)

O planejamento terapêutico global do grupo de Baixo Risco de recidiva (Anexo 6) compreendeu cinco fases: fase da indução com duração de quatro semanas, seguida imediatamente da fase de consolidação da remissão, com duração de duas semanas, a fase da intensificação, com duração de 8 semanas, uma consolidação tardia com duração de 8 semanas e a terapia de manutenção que teve a duração de um ano e meio. O tempo total previsto para duração do tratamento foi de dois anos.

A terapia de manutenção foi alicerçada no par de drogas 6-MP/MTX e iniciada a partir da vigésima segunda semana do tratamento. Antes do início dessa fase, os pacientes foram randomizados para o **Grupo 1** (terapia contínua 6-MP/MTX) ou **Grupo 2** (terapia intermitente MTX/ 6-MP) da terapia de manutenção.

O tratamento básico da terapia de manutenção no Grupo 1, referia-se ao esquema tradicional de tratamento, composto de :

- 6-MP: $50 \text{ mg}/\text{m}^2/\text{dia}$, administrada por via oral, diariamente (dose máxima de $100 \text{ mg}/\text{m}^2/\text{dia}$), ingerido longe do horário das refeições, no sentido de evitar interferências dos alimentos na absorção das drogas.
- MTX: $25 \text{ mg}/\text{m}^2/\text{dose}$ (dose máxima de $40 \text{ mg}/\text{m}^2$), administrado por via intramuscular, semanalmente.
- A cada 8 semanas, iniciando-se na 30^a semana, era introduzido o pulso de vincristina (VCR) e dexametasona, completando um total de 7 pulsos

- A tripla terapia intratecal (MADIT: ARA-C, MTX e PDN) foi realizada a cada 8 semanas, durante toda a manutenção.

A terapia de manutenção do **Grupo 2** utilizou as mesmas drogas. No entanto, a 6-MP e o MTX eram administrados de maneira intermitente:

- MTX: $200\text{mg}/\text{m}^2$, administrado por via endovenosa, em infusão de 6 horas, administrado a cada 21 dias. O resgate com ácido fólico (leucovorin) foi de $5\text{mg}/\text{m}^2/\text{dose}$, administrado por via oral, nas horas 36 e 42 após o início do MTX.
- 6-MP: $100\text{mg}/\text{m}^2/\text{dia}$, administrada por via oral, durante 10 dias, iniciando 24 horas após a primeira dose do MTX. Dose máxima diária de 175mg.

Durante a fase de manutenção do **Grupo 1**, os ajustes das doses de 6-MP e MTX foram feitos mantendo-se a contagem leucocitária entre $1.500 - 3.000/\text{mm}^3$, com a cifra de fagócitos acima de $300/\text{mm}^3$. Quando as contagens desses parâmetros estivessem abaixo dos níveis especificados, toda a quimioterapia deveria ser suspensa provisoriamente até a recuperação dos níveis leucocitários. Se, por outro lado, durante a fase da manutenção, em dois ou três hemogramas seqüenciais (semanais ou quinzenais), os leucócitos estivessem acima de $3.500/\text{mm}^3$, as doses de 6-MP e MTX deveriam ser aumentadas em 25%.

No **Grupo 2** da terapia de manutenção, não estavam previstos aumentos nas doses de 6-MP e MTX baseados em parâmetros laboratoriais

Para ambos os grupos, a quimioterapia deveria ser suspensa temporariamente, durante a fase de manutenção, se a contagem dos leucócitos estivesse abaixo de $1.000/\text{mm}^3$, e/ou fagócitos abaixo de $300/\text{mm}^3$ e/ou plaquetas abaixo de $50.000/\text{mm}^3$ e/ou presença de infecção e/ou outras condições que impedissem a administração da quimioterapia (transaminases com valores cinco vezes acima do limite da normalidade, bilirrubinas com valores três vezes acima do limite superior da normalidade, linfocitopenia grave $< 500/\text{mm}^3$).

3.3.2.2- GRUPO DE ALTO RISCO DE RECIDIVA (AR)

O planejamento terapêutico global para o Grupo de Alto Risco (Anexo 6), compreendeu sete fases: a fase da indução com duração de seis semanas, o Bloco A e o Bloco B com duração de uma semana cada um, a fase da intensificação com oito semanas de duração, o Bloco C e o Bloco D com uma semana de duração cada, a fase de consolidação tardia (oito semanas) e a fase de manutenção com duração de um ano e meio.

A fase de manutenção deveria ser iniciada na trigésima quarta semana do tratamento e seguia as mesmas orientações para o Grupo 1 do BR (item 3.3.2.1).

3.4- DADOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS

Os dados clínicos e laboratoriais foram obtidos por meio de pesquisa em prontuários arquivados no Serviço de Arquivo Médico (SAME) e no Serviço de Hematologia do HC-UFMG.

O Serviço de Hematologia Pediátrica dispõe de registros individualizados de todos os pacientes com seus dados iniciais, evolutivos, os exames laboratoriais, incluindo mielograma, imunofenotipagem e relato das intervenções terapêuticas às quais foram submetidos. Os dados clínicos, os exames laboratoriais na admissão e durante toda a evolução, o tratamento e os dados evolutivos de cada paciente foram registrados em protocolo próprio. Para o presente estudo foi desenvolvido um banco de dados específico no programa Excel-2002.

O diagnóstico de LLA foi realizado por esfregaço de medula óssea corado pela solução de *May-Grünwald-Giemsa* e, na maioria dos casos, confirmado por imunofenotipagem.

A determinação da linhagem do clone leucêmico dos casos de LLA baseou-se na classificação do Grupo Europeu para Caracterização Imunológica de Leucemias (EGIL) (BENE *et al.*, 1995), com modificações impostas por limitações no painel de anticorpos monoclonais utilizados (PAES, 2000). Desta forma, as LLA foram classificadas em LLA de linhagem B e de linhagem T. A linhagem B foi definida quando havia expressão de pelo menos dois dos seguintes marcadores B: CD19, CD79a e CD22. A LLA de linhagem B foi

sub-classificada, de forma simplificada, em LLA pré-B CD10 positivo (CD10⁺) ou LLA pré-B CD10 negativo (CD10⁻), por não se dispor do anticorpo anti-imunoglobulina intracitoplasmática (IgM citoplasmática). As LLA classificadas como pré-B CD10⁺ também foram denominadas LLA do tipo CALLA (antígeno comum da LLA). As LLA do tipo *null* foram incluídas no grupo das LLA pré-B CD10⁻. A LLA B madura foi excluída do estudo. A LLA de linhagem T foi definida pela expressão de CD3 em membrana ou intracitoplasmática. Quando negativa, a LLA foi considerada T caso apresentasse positividade para CD2 e CD7 e negatividade para CD22 e/ou CD79a e mieloperoxidase (MPO). Não foi possível proceder à sub-classificação deste grupo pela indisponibilidade de CD1a, antiTCR α/β e anti-TCR γ/δ no laboratório da Instituição (PAES, 2000).

Como em grande número de casos não foram obtidas metáfases para realização de análise citogenética, optou-se pela não utilização deste parâmetro para caracterização dos pacientes neste estudo.

A remissão medular foi definida como porcentagem de blastos inferior a 5% do total de elementos nucleados, em um esfregaço medular com a presença das três séries normais (granulocítica, eritrocítica e megacariocítica) bem representadas.

A recidiva medular foi definida como reaparecimento de células leucêmicas na medula óssea em proporção $\geq 5\%$ dos elementos nucleados (M2) ou $\geq 25\%$ (M3). A recidiva poderia ser isolada em medula óssea ou combinada, quando houvesse envolvimento concomitante do sistema nervoso central, ou testículos ou outros sítios.

O envolvimento do sistema nervoso central foi definido como presença de blastos em esfregaço de líquido com contagem de mononucleares > 5 células/mm³, com presença inquestionável de blastos leucêmicos.

3.5- ISOLAMENTO DE DNA GENÔMICO

Para o isolamento do DNA genômico foram utilizados como material sangue periférico, concentrado de hemácias ou esfregaço de medula óssea.

O sangue total foi obtido no momento das coletas de rotina para realização de hemogramas. Portanto, não foi coletado sangue exclusivamente para a realização do estudo. O anticoagulante utilizado foi o EDTA (etilenodiaminotetracetato).

Nos casos em que o paciente já havia falecido ou recebido alta hematológica, foi utilizado concentrado de hemácias armazenado a -20° C. Este material foi obtido durante o estudo para dosagem dos metabólitos da 6-MP (OLIVEIRA *et al*, 2004c)

Quando não havia sangue total ou concentrado de hemácias disponíveis, foram utilizadas lâminas com esfregaço de medula óssea obtido no 28^o dia de tratamento. As lâminas encontravam-se arquivadas no Serviço de Hematologia do HC-UFMG e haviam sido coradas previamente pela solução de *May-Grünwald-Giemsa*.

O DNA genômico foi extraído a partir de amostras de sangue total em 95 casos. Em 13 casos foi utilizado o concentrado de hemácias e em 8 o esfregaço de medula óssea.

Foram testados dois métodos para isolamento do DNA genômico a partir do sangue total, o kit DNAzol^R (INVITROGEN) e o método Fenol-clorofórmio (SAMBROOK *et al.*, 1989). Para a obtenção de DNA genômico a partir dos esfregaços de medula óssea foi utilizado um método simples descrito no item 3.5.3. Os três métodos serão descritos a seguir.

3.5.1- MÉTODO DO DNAZOL (INVITROGEN)

As células sanguíneas foram lisadas através da homogeneização com a pipeta. Ao tubo contendo 200 μ l de sangue total foi acrescentado 1ml de DNAzol. Centrifugar a 10.000 g durante 10 min. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, que foi adicionado de 0,5 ml de álcool 100% a 4 $^{\circ}$ C. Misturar por inversão e incubar por 3 min a temperatura ambiente. Centrifugar a 4.000 g por 2 min. O sobrenadante foi descartado e o DNA precipitado lavado 2 vezes com álcool 70% a 4 $^{\circ}$ C, centrifugar a 15.000g a 4 $^{\circ}$ C. O tubo contendo o sedimento foi deixado aberto a 37 $^{\circ}$ C por 1 min para a evaporação do álcool. O DNA foi ressuspendido em 20 μ l de NaOH 8 mM, conforme sugerido pelo fabricante e estocado a -20 $^{\circ}$ C. Para a amplificação por PCR foi utilizado 100ng da amostra como fonte de DNA molde. Este método foi utilizado nos testes de escolha para isolamento do DNA, mas não foi o escolhido para a extração das amostras de sangue total.

3.5.2- MÉTODO FENOL/CLOROFÓRMIO (SAMBROOK *et al.*, 1989)

Ao tubo contendo 200µl de sangue total ou concentrado de hemácias foi adicionado 100µl de tampão de extração (50mM Tris HCl, pH 8,0, 50 mM EDTA, 100 mM NaCl, SDS 1%) e proteinase K a 50µg/ml. A amostra foi incubada a 37°C por 16 h ou 55°C por 3h com agitação, para digestão do material. Foi adicionado volume igual de fenol e a amostra foi agitada por 10 min em agitador de inversão, até formar uma emulsão. Centrifugar a 15.000 g por 10 min à temperatura ambiente. A fase aquosa superior foi retirada e transferida para um novo tubo, acrescentando-se, aproximadamente, metade de seu volume, de fenol e metade de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1). A amostra foi agitada por 10 min e centrifugada a 15.000 g por 10 min. A fase aquosa superior foi retirada e transferida para novo tubo, onde se adicionou volume igual de clorofórmio-álcool isoamílico. A amostra foi novamente agitada e centrifugada. A fase aquosa superior foi transferida para novo tubo e depois acrescentado 1/10 deste volume de acetato de sódio 3M, pH 5,2. Adicionar 2,5 volumes de etanol a 100% a 4°C, homogeneizar suavemente e colocar o tubo a -70°C por 1h. Centrifugar a 15.000 g por 10 min a 4°C. O sedimento foi lavado 2 vezes com etanol a 70%, a 4°C, centrifugando a 15.000 g por 10 min, a 4°C. O sobrenadante etanólico foi eliminado e o tubo contendo o sedimento foi incubado, com a tampa aberta, a 37°C para evaporar o etanol remanescente. O DNA foi ressuscitado em 25µl de tampão TE (10mM Tris, 1mM EDTA, pH 8,0) e estocado a -20°C.

No material obtido a partir de concentrado de hemácias foram utilizados 2µl da amostra como fonte de DNA molde nas reações de PCR e no obtido de sangue total foi utilizado 100ng. Este método foi o escolhido para extrair DNA de todas as amostras de sangue total, uma vez que mostrou-se capaz de isolar DNA genômico mesmo em amostras congeladas a -20°C.

3.5.3- ESFREGAÇÃO DE MEDULA ÓSSEA EM LÂMINAS CORADAS PELO MÉTODO DE MAY-GRÜNWARD-GIEMSA

Para a obtenção de DNA de lâminas contendo esfregaço de medula óssea, as lâminas eram levadas ao microscópio e marcadas no local onde havia concentração de

células nucleadas. Nesta marcação, foram depositados 10µl de água deionizada e após a raspagem, o material ressuspendido foi transferido para tubos etiquetados. A área foi lavada com outros 10 µl de água deionizada que também foram transferidos para os tubos com auxílio de uma micropipeta. A operação foi repetida em uma segunda área da lâmina e, em seguida, o material foi aquecido a 70°C por 10 min, centrifugado a 13.000 rpm por 5min, à temperatura ambiente e o sobrenadante (cerca de 30µl) foi estocado a -20°C. Foram aplicados 2 µl do sobrenadante nas reações de PCR como fonte de DNA molde.

3.5.4- DOSAGEM DAS AMOSTRAS DE DNA

A dosagem das amostras de DNA obtidas a partir de sangue total foi realizada em espectrofotômetro (Eppendorf). Foi observada a absorvância para ácidos nucléicos que é obtida no comprimento de onda de 260 nanômetros (nm), na qual uma unidade de absorvância 260 nm corresponde a 50ng/µl de ácidos nucléicos e a absorvância para proteína obtida no comprimento de onda 280 nm. A pureza para ácidos nucléicos foi observada pela relação das absorvâncias A260/280. Este valor indica a relação DNA/proteína e conseqüentemente a pureza da amostra de DNA. As amostras que não apresentavam valor de pureza satisfatório ($A_{260}/A_{280} > 2$) foram lavadas com etanol 70%. A dosagem do DNA não foi realizada nas amostras obtidas de concentrado de hemácias e de esfregaço de medula óssea, devido ao pequeno volume e a baixa concentração de DNA obtidos nestas amostras.

3.6- PCR (REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE) – ARMS (SISTEMA DE AMPLIFICAÇÃO REFRAATÁRIO A MUTAÇÃO) MULTIPLEX

A PCR foi realizada para avaliar a freqüência das quatro variantes alélicas do gene da TPMT: *2 (238G>C), *3A (460G>A e 719A>G), *3B (460G>A) e *3C (719A>G).

Foi utilizada a estratégia do sistema *multiplex* de amplificação refratária a mutação (ARMS *multiplex*) descrito por ROBERTS e colaboradores (2004). O ARMS é um sistema que permite a genotipagem de SNPs (*single nucleotide polymorphism*) através somente da PCR, sem necessidade de enzimas de restrição e sequenciamento dos produtos da PCR.

Este sistema possibilita a detecção simultânea do polimorfismo dos nucleotídeos 238 G>C, 460G>A e 719A>G, que definem os alelos *TPMT *2*, *TPMT*3A*, *TPMT *3B* e *TPMT *3C*.

No ARMS é desenhado um par de iniciadores direcionado para o *locus* normal e outro par específico para o *locus* com mutação. Assim, o DNA normal e o mutado (se houver a mutação) são amplificados. Nesta técnica é importante a presença de um par de iniciadores direcionado para uma região do DNA genômico que não está sendo estudada para funcionar como controle positivo da reação (NEWTON *et al.*, 1989). Neste estudo foi utilizado o par de iniciadores β 2M como controle positivo da PCR que é complementar a uma seqüência de 574pb do gene da beta-2-microglobulina, não relacionada ao gene *TPMT*.

Neste trabalho foram utilizados os iniciadores desenhados por ROBERTS e colaboradores (2004). Nestes iniciadores a última base da porção 3' é complementar ao nucleotídeo normal ou mutado. Para maximizar a especificidade alélica foi introduzido um pareamento incorreto no penúltimo nucleotídeo na porção 3' em cada iniciador alelo específico (Tabela 4 - bases sublinhadas). Para evitar a coamplificação de seqüências de um pseudogene os iniciadores comuns foram desenhados complementares a seqüências intrônicas.

Tabela 4 - Iniciadores utilizados no experimento ARMS *multiplex* TPMT (ROBERTS *et al.*, 2004).

Iniciador	Mutação	PCR	Amplicon (pb)	Seqüência (5' →3')
β 2M <i>forward</i>	-	ARMS1	574	TGTAACACTTGGTGCCTGATATAGCTTGA
		ARMS2		
B2M <i>reverse</i>	-	ARMS1	574	CATCAGTATCTCAGCAGGTGCCACTAATCT
		ARMS2		
TPMT238 comum #	-	ARMS1	194	ATCTGCTTTCCTGCATGTTCTTTGAAACCC
		ARMS2		
TPMT238 normal ¥	-	ARMS1	194	CACACCAACTACACTGTGTCCCCGGTCT <u>CC</u>
TPMT238 mutado §	238G>C	ARMS2	194	CACACCAACTACACTGTGTCCCCGGTCT <u>CG</u>
TPMT460 comum #	-	ARMS1	245	AGGTCTCTGTAGTCAAATCCTATACT
		ARMS2		
TPMT460 normal ¥	-	ARMS1	245	ATTTGACATGATTTGGGATAGAGG <u>TG</u>
TPMT460 mutado §	460G>A	ARMS2	245	ATTTGACATGATTTGGGATAGAGG <u>TA</u>

TPMT719 comum #	-	ARMS1	325	ATTTTTAGTAGAGACAGAGTTTCACCATCT
		ARMS2		
TPMT719 normal ¥	-	ARMS1	325	TATGTCTCATTACTTTTCTGTAAGTAGIT
TPMT719 mutado §	719A>G	ARMS2	325	TATGTCTCATTACTTTTCTGTAAGTAGIC

Nucleotídeos sublinhados – base modificada para ocorrer pareamento incorreto

- iniciadores comuns que fazem par tanto com os iniciadores direcionados para o DNA normal quanto para o mutado.

¥ - iniciadores específicos para o DNA normal

§ - iniciadores específicos para a mutação

A PCR alelo específica foi otimizada separadamente e posteriormente os iniciadores foram agrupados em ARMS1 e ARMS2. No ARMS1 foram colocados os iniciadores específicos para os alelos normais 238G e 460G e o iniciador específico para o alelo mutado 719G. No ARMS 2 foram colocados os iniciadores específicos para o alelo normal 719A e para os alelos mutados 238C e 460A (Tabela 5) (ROBERTS *et al.*, 2004).

Tabela 5 - Agrupamento dos iniciadores em ARMS 1 e ARMS2 (ROBERTS *et al.*, 2004).

Iniciadores	PCR- ARMS	Alelo <i>TPMT</i>
TPMT238 normal (WT)	ARMS1	<i>TPMT*1</i>
TPMT238 mutado (MUT)	ARMS2	<i>TPMT*2</i>
TPMT460 normal (WT)	ARMS1	<i>TPMT*1</i>
TPMT460 mutado (MUT)	ARMS2	<i>TPMT3*A</i>
TPMT 719 normal (WT)	ARMS2	<i>TPMT*1</i>
TPMT719 mutado (MUT)	ARMS1	<i>TPMT3*A</i> e <i>TPMT*3C</i>
β2M	ARMS1 e ARMS2	-

O agrupamento dos iniciadores em ARMS1 e ARMS2 é importante, pois em uma mesma reação são misturados: o par de iniciadores usado como controle positivo da PCR (β2M- Tabela 4 e 5), e os iniciadores direcionados ao alelo normal e ao mutado do gene *TPMT*. Assim, existe uma segurança de que a PCR realmente funcionou, pois além do par de iniciadores utilizado como controle positivo, há os iniciadores direcionados aos alelos normais, cuja frequência esperada é alta e o iniciador direcionado ao alelo mutado, que só amplifica o DNA se o indivíduo tiver a mutação.

É importante destacar que o alelo *TPMT*2* é visualizado através do iniciador TPMT238MUT, o alelo *TPMT*3A* é caracterizado por duas mutações, então é visualizado através dos iniciadores TPMT460MUT e TPMT719MUT, o alelo *TPMT*3B* pelo iniciador TPMT460MUT somente e o *TPMT*3C* pelo TPMT719MUT somente. Já o alelo *TPMT*1* é visualizado pelos iniciadores TPMT238WT, TPMT460WT e TPMT719WT (Tabela 5).

Para a realização da PCR alelo específica as condições de temperatura e concentrações de reagentes estabelecidas por ROBERTS e colaboradores (2004) foram testadas para cada iniciador isoladamente. Posteriormente, a concentração de *Taq* DNA polimerase (1 e 0,50U), do MgCl₂ (1,5; 3 e 4,5mM), dos iniciadores (5 e 10pmoles), do DNA (0,1, 1, 10 e 100ng) e o volume final de reação (10 µl e 25µl) foram testados.

Após a otimização da PCR alelo específica, os iniciadores foram agrupados em *multiplex*. A PCR *multiplex* é uma variante da PCR na qual dois ou mais *loci* são simultaneamente amplificados na mesma reação (HENEGARIU *et al.*, 1997). Esta PCR foi possível somente com DNA extraído de sangue total.

Para a PCR utilizamos 0,50 U de *Taq* DNA polimerase (INVITROGEN), tampão da enzima, fornecido pelo fabricante (Tris-HCl 10mM pH 8,0, 1,5mM de MgCl₂, KCl 50mM), 4,5mM de MgCl₂, 10 pmoles de cada iniciador, dNTPs (200µM de cada um dos desoxirribonucleotídeos) e 100ng de DNA humano para um volume final de 10 µl. A PCR foi realizada em termociclador *Thermo Hybaid*, com 5 min a 95°C para desnaturação da fita de DNA, e 35 ciclos consistindo de 30 seg a 95°C para desnaturação, 30 seg de anelamento para os iniciadores, na temperatura calculada para cada iniciador, 30 seg a 72°C para extensão, finalizando com uma extensão de 5 min a 72° C e mantido a 4°C após o término da reação.

3.6.1- ANÁLISE DOS PRODUTOS DE PCR POR ELETROFORESE EM MINIGÉIS DE POLIACRILAMIDA

Os produtos de PCR, correspondentes aos alelos foram detectados após fracionamento em gel de acrilamida, corados pela prata. Três microlitros dos produtos de amplificação por PCR foram submetidos à eletroforese em mini gel de poliacrilamida a 8%, fixados em 150ml de etanol a 10% (v/v) com 0,5% de ácido acético (v/v) e corados com

nitrate de prata a 0,3%. Os géis foram lavados em água deionizada e revelados em solução aquosa de hidróxido de sódio a 3% (p/v) com 0,5% de formaldeído (v/v), até o aparecimento das bandas (SANGUINETTI *et al.*, 1994).

3.7- DOSAGEM DOS METABÓLITOS DA 6-MERCAPTOPURINA (6-MP)

A dosagem dos metabólitos da 6-MP foi realizada em pesquisa desenvolvida por OLIVEIRA *et al.* 2004c, no qual foram avaliados 36 pacientes incluídos no presente estudo. Foram selecionados para dosagem dos metabólitos da 6-mercaptopurina os pacientes com previsão do término do tratamento até dezembro de 2001.

As amostras de sangue periférico para dosagem intra-eritrocitária dos metabólitos da 6-MP (nucleotídeos da 6-tioguanina - 6-TGN e metilmercaptopurina - MMP) foram coletadas a partir da oitava semana da fase de manutenção do tratamento com intervalo aproximado de oito semanas entre as coletas. O paciente deveria estar em uso contínuo da 6-MP por um período mínimo de quatro semanas e não ter recebido transfusão de concentrado de hemácias nas seis semanas precedentes à coleta. O número mínimo de amostras previsto para cada grupo de pacientes foi definido de acordo com a duração da fase de manutenção, variando de 2 a 6 amostras.

As amostras foram preparadas a partir do sangue total coletado para realização de hemogramas. O anticoagulante utilizado foi o EDTA. As hemácias foram preparadas de acordo com o método descrito por LENNARD (LENNARD, 1987). Os nucleotídeos da 6-tioguanina (6-TGN) e metilmercaptopurina (MMP) foram separados e quantificados em uma mesma amostra através de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), utilizando metodologia que combinou o método de extração das tiopurinas recomendado por DERVIEUX & BOULIEU (DERVIEUX & BOULIEU, 1998) e o método de análise proposto por LENNARD & SINGLETON (LENNARD & SINGLETON, 1992), que permite a determinação simultânea desses metabólitos da 6-MP nos eritrócitos. Os metabólitos 6-TGN e MMP tiveram sua concentração intra-eritrocitária medida em pmol/ 8×10^8 hemácias e nmol/ 8×10^8 hemácias, respectivamente (Anexo 7). A padronização e a validação dessa nova metodologia foi realizada por OLIVEIRA *et al.*, 2004c.

3.8- DEFINIÇÃO DE VARIÁVEIS

As seguintes variáveis foram associadas a cada criança.

- Idade (IDADEDX): número fracionado em meses, obtido pela subtração da data de nascimento em relação à data do diagnóstico de leucemia.

- Gênero (SEX0): masculino (1) ou feminino (2).

- Leucometria ao diagnóstico (LEUINI): número global de leucócitos no sangue periférico quando do diagnóstico da doença.

- Média das doses de 6-Mercaptopurina (6-MP): valor correspondente à média das doses diárias de 6-MP prescritas para cada criança durante a fase de manutenção do tratamento. O cálculo foi feito através da soma de todas as doses/m², dividindo-se a dose acumulada pela duração total do período de manutenção em dias. É expressa em mg/m²/dia.

- Média das doses de Metotrexato (MTX): valor correspondente à média das doses semanais de MTX prescritas para cada criança durante a fase de manutenção do tratamento. O cálculo foi feito através da soma de todas as doses/m², dividindo-se a dose acumulada pela duração total do período de manutenção em semanas. É expressa em mg/m²/semana.

Para o cálculo das doses de 6-MP e MTX, a superfície corporal de cada paciente foi obtida observando-se os dados de peso e estatura anotados e utilizando-se nomograma baseado na fórmula de Du Bois (Du BOIS & Du BOIS, 1916). O valor foi expresso em m².

- Dias de interrupção da quimioterapia durante a fase de manutenção (QTT): porcentagem correspondente ao número de dias nos quais o paciente permaneceu sem receber quimioterapia, 6-MP e MTX, em relação a duração total da fase de manutenção.

- Mediana das contagens de leucócitos (MEDLEU): valor correspondente à mediana das contagens de leucócitos apresentadas pelo paciente durante a fase de manutenção da

quimioterapia. É uma forma indireta de avaliação da intensidade da quimioterapia através da mielossupressão alcançada.

- Mediana das contagens de neutrófilos (MEDNEUT): valor correspondente à mediana das contagens absolutas de neutrófilos apresentadas pelo paciente durante as consultas médicas realizadas na fase de manutenção. É uma forma indireta de avaliação da intensidade da quimioterapia através da mielossupressão alcançada.

- Média das dosagens do metabólito 6-TGN: valor correspondente à média das dosagens de 6-TGN apresentadas pelo paciente durante a fase de manutenção. O cálculo foi feito através da soma de todas as dosagens, dividindo-se a o valor desta soma pelo número de amostras colhidas. É expressa em $\text{pmol}/8 \times 10^8$ hemácias.

- Média das dosagens do metabólito MMP: valor correspondente à média das dosagens de MMP apresentadas pelo paciente durante a fase de manutenção. O cálculo foi feito através da soma de todas as dosagens, dividindo-se a o valor desta soma pelo número de amostras colhidas. É expressa em $\text{nmol}/8 \times 10^8$ hemácias.

- Genótipo (TPMT): se a criança possui a mutação no alelo *TPMT* (MUT) ou se possui o alelo comum ou selvagem (WT- *wild type*), sendo assim codificado - um (1) homocigoto para o alelo selvagem e zero (0) heterocigoto para alguma das mutações estudadas no gene *TPMT*.

- Sobrevida livre de eventos (SLE): tempo decorrido entre o diagnóstico e a ocorrência de qualquer um dos seguintes eventos: óbito em remissão ou ocorrência de recidiva da leucemia em qualquer sítio.

- Variável de censura para sobrevida livre de eventos (CENS1), assim codificada: zero (0), paciente censurado na data da análise dos resultados porque não ocorreu qualquer evento; um (1) ocorrência de evento, como definido acima.

- Sobrevida Global (SG): tempo decorrido entre o diagnóstico e o óbito, independente da causa.

- Variável de censura para sobrevida global (CENS2), assim codificada: zero (0), paciente censurado na data da análise dos resultados porque estava vivo;um (1) ocorrência do óbito

Foi estudada a possível associação entre genótipo e as seguintes variáveis: gênero, média das doses de 6-MP, média das doses de MTX, dias de interrupção da quimioterapia, mediana das contagens de leucócitos e mediana das contagens de neutrófilos, dosagem dos metabólitos 6-TGN e MMP.

Um paciente foi excluído dessas análises, uma vez que foi tratado com esquema quimioterápico diferente dos utilizados nos protocolos do GBTLI LLA (Identificação nº 27- Anexo 8). Portanto, foram incluídos na maioria das análises estatísticas 115 pacientes.

Cento e nove pacientes foram incluídos nas análises referentes às variáveis 6-MP, MTX e MEDLEU. Além do paciente número 27, seis pacientes foram excluídos porque receberam doses diferenciadas de 6-MP e MTX durante a fase de manutenção, de acordo com randomização prevista no estudo GBTLI LLA - 99 (**Grupo 2-** item 3.3.2).

A mediana de neutrófilos (MEDNEU) foi calculada apenas para 100 pacientes. Foram excluídos os sete pacientes citados acima. Em outros nove casos não havia anotações suficientes no prontuário médico para o cálculo desta mediana.

3.9- MÉTODOS ESTATÍSTICOS

A eventual associação entre o genótipo e variáveis categóricas foi analisada com o teste do qui-quadrado.

O teste t de Student foi utilizado para testar a possível associação do genótipo com variáveis contínuas que apresentaram distribuição normal. A possível associação do genótipo com variáveis contínuas que não apresentaram distribuição normal foi analisada com o teste estatístico não-paramétrico de Mann-Whitney.

O método de Kaplan-Meier foi utilizado para estimar a probabilidade de sobrevida global e de sobrevida livre de eventos (KAPLAN & MEIER, 1958). O teste de log-rank foi utilizado para comparação entre as curvas de sobrevida. Os cálculos e as curvas de sobrevida foram feitas no programa EGRET versão 026.6.

Os cálculos foram feitos no programa MINITAB versão 13.0 e os gráficos no programa Grapad Prism 4.

Em todos os testes estatísticos foi adotado como estatisticamente significativo o valor de $p < 0,05$ em relação ao erro alfa.

4- RESULTADOS

4.1- RESULTADOS GLOBAIS

Foram admitidos no estudo 116 pacientes que iniciaram a fase de manutenção dos protocolos terapêuticos GBTLI LLA - 93 (n = 72) e GBTLI LLA - 99 (n = 44) no período de maio de 1993 a fevereiro de 2001.

Apenas a criança com número de identificação 17 (Anexo 8) não havia terminado a quimioterapia na data de análise dos resultados (dezembro de 2006). Como havia completado 19 meses da fase de manutenção da quimioterapia e o término do tratamento estava previsto para janeiro de 2007, este paciente foi incluído em todas as análises.

Nos casos em que a recidiva da leucemia ocorreu durante a fase de manutenção da quimioterapia, os dados clínicos e laboratoriais foram coletados até o momento da recidiva.

Dos 116 pacientes analisados, 58 eram do sexo masculino e 58 do sexo feminino.

A idade dos pacientes ao diagnóstico variou de seis meses a 16 anos, com mediana de 4,4 anos. A leucometria ao diagnóstico variou de 594 a 376.000 células/mm³, com mediana de 7.800 células/mm³.

A imunofenotipagem de 115 pacientes mostrou: 5 do tipo pré-B, 79 do tipo CALLA, 15 do tipo T, 4 do tipo *null* e 1 indiferenciada. Em 11 casos a imunofenotipagem não foi realizada. O dado referente ao paciente 27 não estava disponível.

A distribuição dos pacientes em grupos de risco para recidiva de acordo com os critérios do GBTLI LLA - 93 mostrou: 11 no grupo de Risco Básico Verdadeiro (RBV), 39 no grupo de Risco Básico (RB) e 22 de Alto Risco (AR). De acordo com os critérios do protocolo GBTLI LLA - 99, 22 pacientes foram classificados como de baixo risco (BR) e 22 de Alto Risco (AR).

Vinte e oito pacientes apresentaram recidiva da doença (24,1%). Vinte (71,4%), dessas 28 crianças, faleceram. Os óbitos foram consequência de complicações relacionadas à recaída da doença. Na Tabela 6 estão relacionados o local e a época em que ocorreu a recidiva do processo leucêmico. Não houve perda de seguimento na casuística.

Tabela 6 - Local e momento da ocorrência da primeira recaída leucêmica em 28 crianças

Local da recidiva	Durante a fase de manutenção da quimioterapia	Após a suspensão da quimioterapia	Total
Medular isolada	10	9	19
SNC isolada	2	2	4
Medular + SNC	2	1	3
Testicular	0	1	1
Medular + Testicular	0	1	1
Total	14	14	28

4.2- ISOLAMENTO DO DNA GENÔMICO

Para o isolamento do DNA genômico de sangue periférico, foram testados os métodos do kit DNAzol e o método fenol-clorofórmio (Figura 4). Os testes foram realizados com sangue recém coletado de pacientes sem doenças hematológicas. Inicialmente optamos pelo kit DNAzol, que é mais rápido de ser executado e menos tóxico para o indivíduo que lida com os reagentes. Entretanto, quando iniciamos o trabalho com as primeiras amostras de sangue periférico de crianças com LLA, que estavam congelados a -20°C , não foi possível extrair DNA com este método. Decidimos então utilizar o método Fenol-Clorofórmio para isolar DNA de todas as amostras de sangue total. Posteriormente, as amostras de sangue recém coletadas passaram a ser armazenadas a 4°C , mas ainda assim utilizamos o método do fenol-clorofórmio para o isolamento do DNA genômico com a finalidade de manter uma uniformidade no estudo.

Em 21 casos não foi possível a obtenção de sangue periférico para a realização da genotipagem. Nestes casos foi utilizado concentrado de hemácias e esfregaço de medula óssea previamente armazenados.

O concentrado de hemácias utilizado para o isolamento do DNA genômico foi obtido por OLIVEIRA *et al.*, 2004c para dosagem dos metabólitos da 6-MP. O material foi armazenado a -20°C . Das 23 amostras obtidas a partir deste material, em apenas 13 foi

possível o isolamento do DNA. Em 8 casos o DNA genômico foi isolado a partir de esfregaço de medula óssea. O isolamento foi realizado com sucesso nas 8 lâminas.

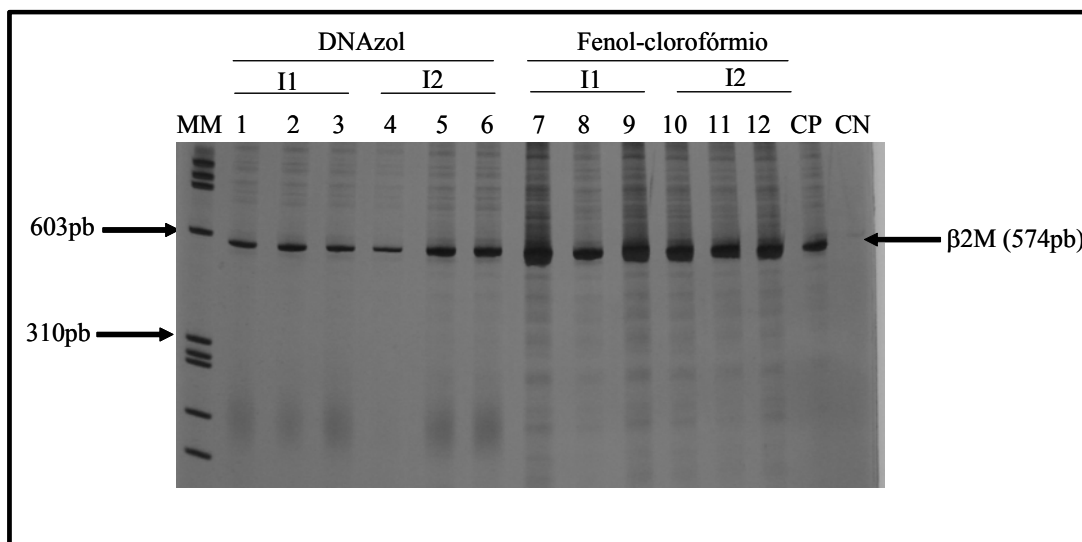


Figura 4 – Produto de amplificação de indivíduos sem doença hematológica, extraídos pelos métodos do *kit* DNAzol e fenol-clorofórmio, utilizando o par de iniciadores β 2M. Banda esperada 574pb. Amostras de DNA visualizadas em gel de acrilamida corado pela prata. O DNA foi extraído de dois indivíduos (canaletas 1, 2, 3, 7, 8, 9 indivíduo I1 e canaletas 4, 5, 6, 10, 11, 12 indivíduo I2). O DNA de cada paciente foi extraído em triplicata para cada método (canaletas 1 a 6 - método de extração DNAzol; canaletas 7 a 12 método de extração Fenol-clorofórmio). Como controle positivo da reação (CP) foi utilizado uma amostra de DNA anteriormente testada. Como controle negativo (CN) o par de iniciadores sem DNA. MM = marcadores de tamanho molecular. pb = pares de bases.

4.3- OTIMIZAÇÃO DA PCR ARMS ALELO ESPECÍFICA E MULTIPLEX

Para a otimização da PCR alelo específica foram testadas as condições estabelecidas por ROBERTS e colaboradores (2004) e não foi possível amplificar amostras de DNA. Posteriormente, algumas concentrações de reagentes e o volume final da reação foram testados. Dentre as concentrações de *Taq* DNA polimerase a que apresentou melhor resultado foi 0,50U, de $MgCl_2$ 4,5mM, de iniciadores 10pmoles, de DNA 100ng e o volume final da reação foi 10 μ l.

A PCR alelo específica foi otimizada separadamente para cada par de iniciadores sob as mesmas condições de temperatura e concentração dos reagentes (ver item 3.6 do métodos) e, posteriormente, os iniciadores foram agrupados em *multiplex* (Figura 5).

Nas amostras de DNA obtidas de concentrado de hemácias e esfregaço de medula óssea não foi possível agrupar os iniciadores em *multiplex*, provavelmente pela pequena quantidade de amostra de DNA obtida. Nestas amostras foi realizada a PCR alelo específica.

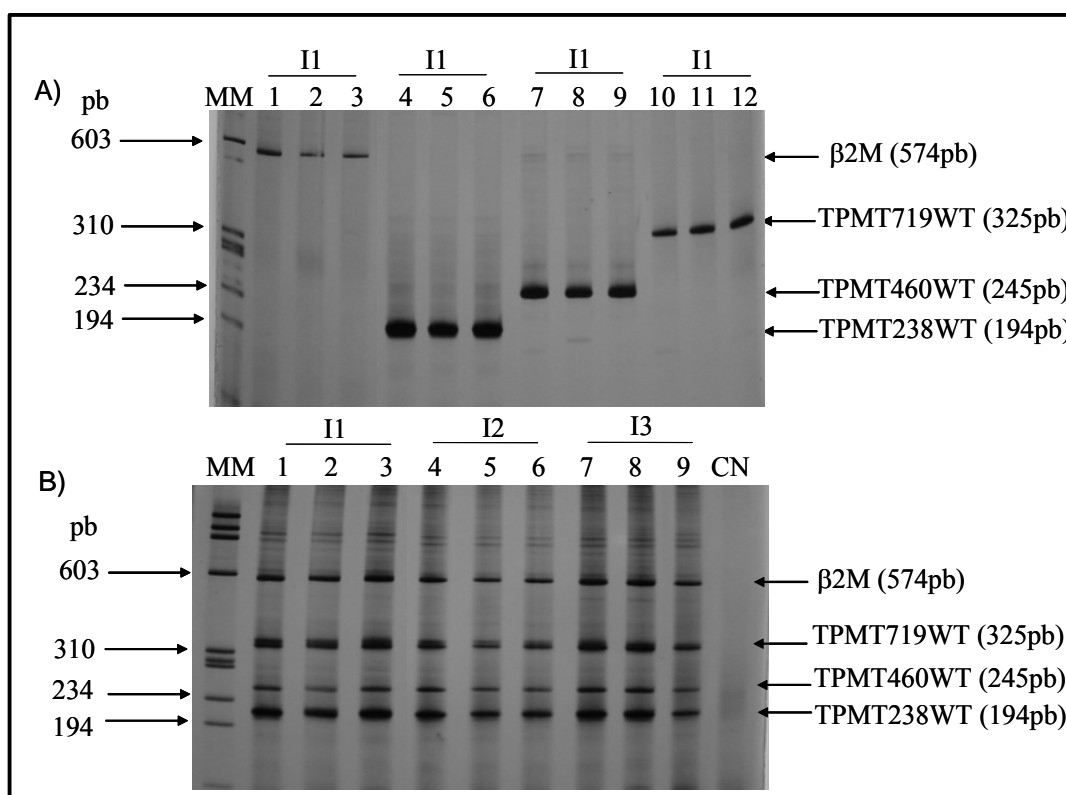


Figura 5 - Produto de amplificação de DNA de indivíduos sem doença hematológica, extraído pelo método Fenol-clorofórmio, mostrando produtos de PCR com os iniciadores β 2M, TPMT719WT, TPMT460WT e TPMT238WT alelo específicos. Amostras de DNA visualizadas em gel de acrilamida corado pela prata. A) PCR alelo específica expondo em cada trio de canaletas o fragmento de DNA amplificado com os quatro iniciadores separadamente. DNA de somente um indivíduo (I1), em triplicata, amplificado com o iniciador β 2M (canaletas 1 a 3) e os iniciadores direcionados para os alelos normais (WT-*wild type*) TPMT238WT (canaletas 4 a 6), TPMT460WT (canaletas 7 a 9) e TPMT719WT

(canaletas 10 a 12). B) PCR-*multiplex* expondo em cada canaleta os fragmentos de DNA amplificados, em uma mesma reação, pelos quatro iniciadores. Três indivíduos saudáveis em triplicata (I1, I2 e I3- cada trio de canaleta corresponde a um paciente) mostrando os alelos β 2M, TPMT719WT, TPMT460WT e TPMT238WT. CN = controle negativo; MM = marcadores de tamanho molecular. pb = pares de bases.

Para o PCR-*multiplex* os iniciadores foram agrupados de forma a serem visualizados em uma canaleta alelos normais (WT) e mutados (MUT). Os grupos foram ARMS1, o qual continha os iniciadores para amplificar os alelos normais TPMT460, TPMT238 e o alelo mutado TPMT719. No ARMS2 foram colocados os pares de iniciadores para o alelo normal TPMT719 e para os mutados TPMT238 e TPMT460. Além do controle positivo β 2M que está presente tanto no ARMS1 quanto no ARMS2 (Figura 6 e Tabela 5) (ROBERTS *et al.*, 2004).

4.4- FREQUÊNCIA DOS ALELOS *TPMT**1, *TPMT**2, *3A, *3B E *3C

Quando foram analisados os 116 pacientes incluídos no estudo, doze (10,3%) apresentaram mutação: um no alelo *TPMT**2 (Figura 6 - canaleta 10), dois no *3C (Figura 6 - canaleta 3) e nove no alelo *3A (Figura 6 - canaletas 5 a 8). Em nenhum paciente foi observado o alelo *TPMT**3B. Todas as mutações foram observadas em heterozigose. Cento e quatro (89,7%) das 116 crianças não apresentaram mutação no gene *TPMT* (Figura 6 - canaletas 1 e 2).

A seguinte distribuição da frequência dos 232 alelos *TPMT* nos 116 pacientes estudados foi encontrada: a variante alélica *TPMT**3A como a mais freqüente (9/232 alelos; 3,9%), seguida pela *3C (2/232; 0,9%), *2 (1/232; 0,4%) e *3B (nenhum alelo; 0%) (Figura 7).

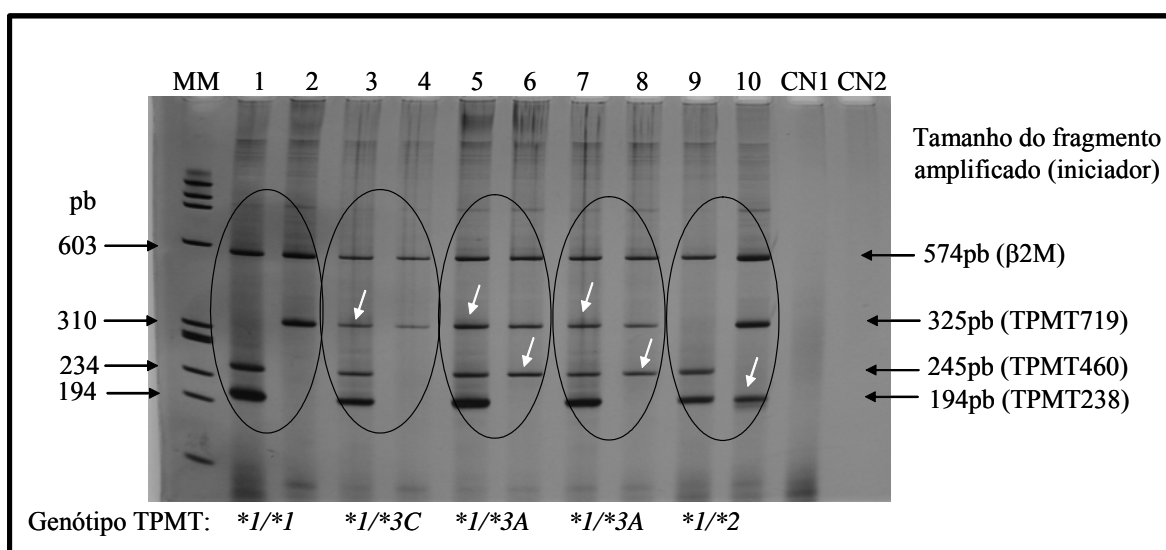


Figura 6- PCR-ARMS *multiplex* para detecção dos alelos *TPMT*1*, *TPMT*2*, *TPMT*3A*, *TPMT*3B* e *TPMT*3C* em crianças com LLA. Produtos de amplificação do DNA extraído de sangue total, separados em gel de acrilamida, corado pela prata, mostrando a presença dos alelos normais (WT) e mutados (MUT). Cada par de canaletas representa um paciente. Foram utilizados dois conjuntos de pares de iniciadores: ARMS1 (canaletas ímpares) TPMT719MUT, TPMT460WT e TPMT238WT; ARMS2 (canaletas pares) TPMT719WT, TPMT460MUT e TPMT238MUT. Como controle positivo em todas as canaletas foi utilizado um par de iniciadores específicos para o gene da β 2microglobulina (β 2M). Como controles negativos, os dois conjuntos de iniciadores sem DNA (CN1 e CN2). As canaletas 1 e 2 mostram um indivíduo com o genótipo normal (*TPMT*1*) para os 4 alelos investigados. As canaletas 3 e 4 mostram um indivíduo *TPMT*1/TPMT*3C*. As canaletas 5, 6, 7 e 8 mostram dois indivíduos *TPMT*1/TPMT*3A* e as canaletas 9 e 10 um indivíduo *TPMT*1/TPMT*2*. As setas brancas indicam os alelos mutados. Os círculos delimitam cada paciente. MM = marcadores de tamanho molecular (pb = pares de bases).

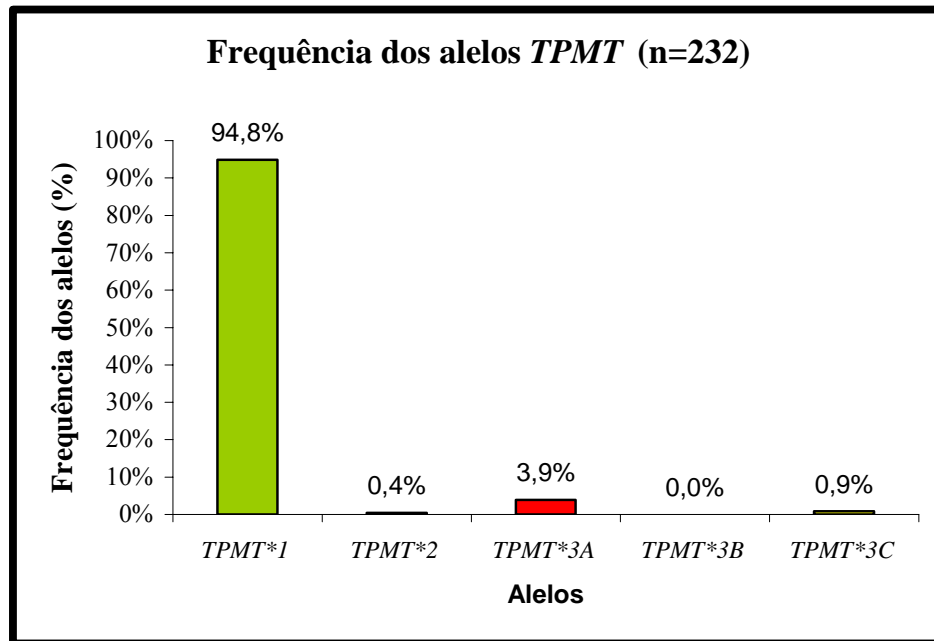


Figura 7- Frequência alélica do gene *TPMT* em uma população de 116 pacientes com LLA

4.5- GENÓTIPO *versus* GÊNERO

Não foi observada associação significativa entre a presença de mutação no gene *TPMT* e o gênero ($p = 0,5$). A Figura 8 representa a frequência de indivíduos que possuem a mutação de acordo com o gênero.

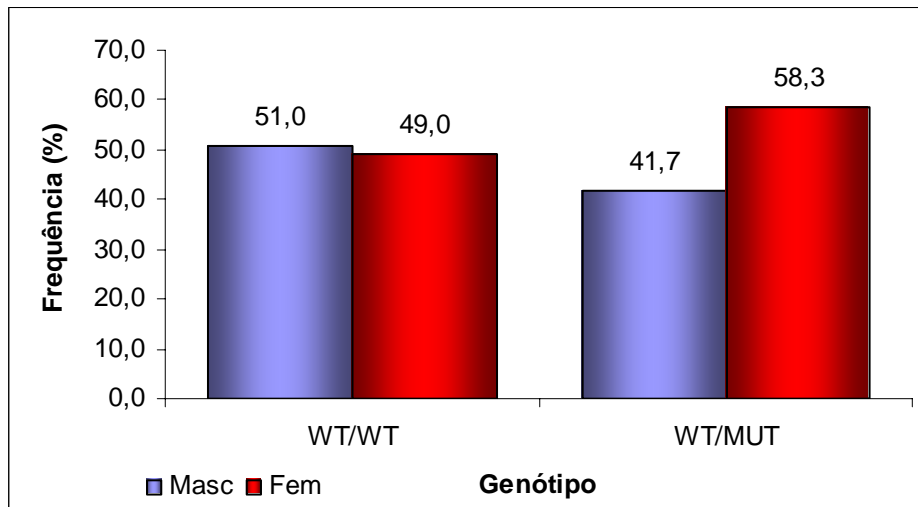


Figura 8- Associação entre genótipo e gênero em 116 pacientes com LLA. WT/WT (*wild type*): paciente sem mutação no gene *TPMT* – WT/MUT: pacientes heterozigotos para as mutações estudadas ($p = 0,5$).

4.6- MEDIANA DA CONTAGEM DE LEUCÓCITOS E NEUTRÓFILOS *versus* GENÓTIPO

A mediana de leucócitos durante toda a fase de manutenção do tratamento variou de 1.160 a 7.000 células/mm³, com mediana de 3.500 células/mm³ para todo o grupo. No grupo de pacientes com mutação no gene *TPMT* a mediana foi de 3.300 células/mm³. No grupo sem mutação a mediana foi de 3.500 células/mm³. Não foi observada associação significativa entre o genótipo e a mediana de contagem de leucócitos ($p = 0,48$) (Figura 9). Foram incluídos nesta análise 109 pacientes (ver item 3.8 dos métodos).

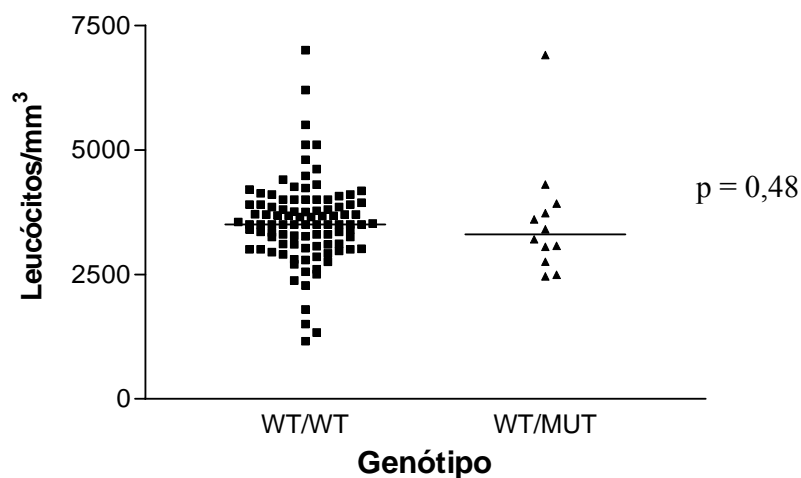


Figura 9 – Associação entre genótipo e mediana de contagem de leucócitos em 109 pacientes com LLA – WT/WT: pacientes sem mutação no gene *TPMT* – WT/MUT: pacientes heterozigotos para as mutações estudadas.

A mediana da contagem de neutrófilos variou de 647 a 4.200 células/mm³, com mediana de 1.674,5 células/mm³ para todo o grupo. No grupo de pacientes com mutação no gene *TPMT* a mediana foi de 1.608 células/mm³. No grupo sem mutação a mediana de 1.681 células/mm³. Também não foi encontrada associação significativa entre o genótipo e a mediana da contagem de neutrófilos ($p = 0,59$) (Figura 10). Foram incluídos nesta análise 100 pacientes (ver item dos métodos 3.8).

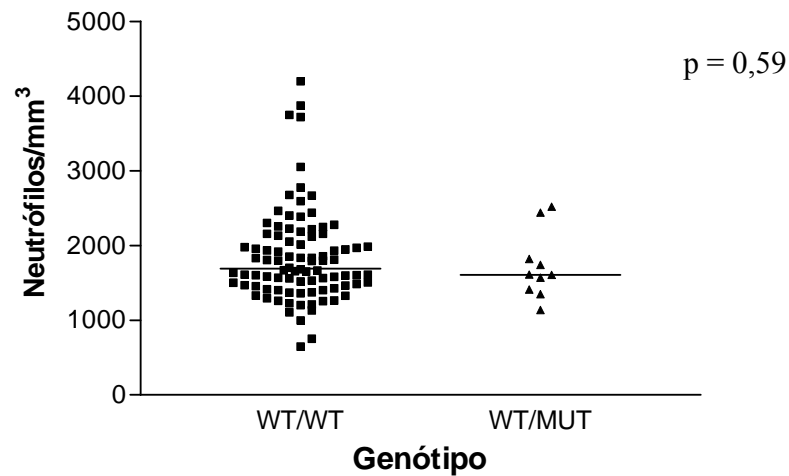


Figura 10– Associação de genótipo e mediana da contagem de neutrófilos em 100 pacientes com LLA – WT/WT: pacientes sem mutação no gene *TPMT* – WT/MUT: pacientes heterozigotos para as mutações estudadas.

4.7- TEMPO DE INTERRUPTÃO DA QUIMIOTERAPIA *versus* GENÓTIPO

O tempo total de interrupção da quimioterapia, que significa o número de dias em que o paciente permaneceu sem receber 6-MP e/ou MTX (ver item 3.8 dos métodos) durante a fase de manutenção, variou de 0 a 46% do tempo total de duração da manutenção (mediana de 7,25%). Na maioria dos casos houve interrupção simultânea das duas drogas.

No grupo de pacientes sem mutação no gene *TPMT* a interrupção do tratamento variou de 0 a 35% com mediana de 7%. No grupo de pacientes portadores de mutação o tempo de interrupção da quimioterapia variou de 1% a 46% com mediana de 10%. Cinco pacientes não interromperam a quimioterapia, e nenhum destes possuía mutação.

O tempo de interrupção da quimioterapia como variável contínua não mostrou associação significativa com o genótipo ($p = 0,26$) (Figura 11).

Na categorização da variável os pacientes foram distribuídos em dois grupos: grupo 1, aqueles pacientes com tempo de interrupção inferior a mediana ($< 7,25\%$); grupo 2, pacientes com tempo de interrupção superior a mediana ($> 7,25\%$). Também não foi encontrada associação entre o genótipo e o tempo de interrupção de quimioterapia, enquanto variável categórica ($p = 0,25$).

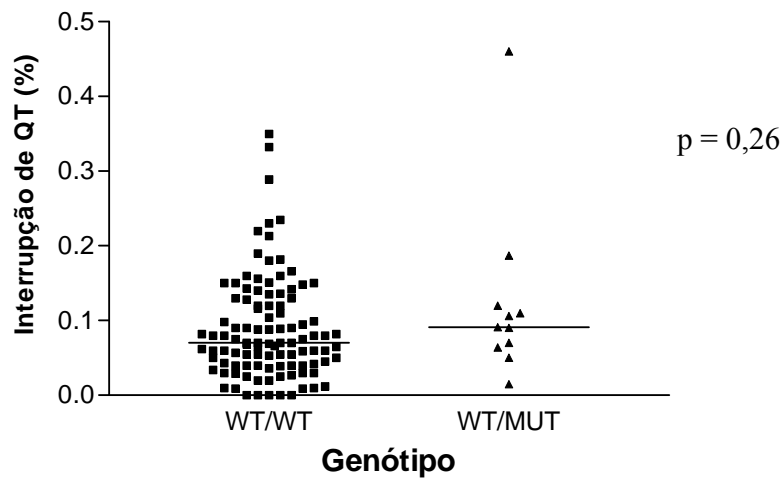


Figura 11- Associação entre genótipo e porcentagem de tempo de interrupção de quimioterapia (QT) como variável contínua em 115 pacientes com LLA – WT/WT: pacientes sem mutação no gene *TPMT* – WT/MUT: pacientes heterozigotos para as mutações estudadas.

4.8- MÉDIAS DAS DOSES DE 6-MP E MTX *versus* GENÓTIPO

Cento e nove pacientes foram incluídos na análise das médias das doses de 6-MP e MTX (ver item 3.8 dos métodos).

A média das doses de 6-MP prescritas para todo o grupo de pacientes durante a fase de manutenção do tratamento variou de 18,5 a 74,9 mg/m²/dia (média 45,6 mg/m²/dia). No grupo de indivíduos com mutação, a dose de 6-MP prescrita variou de 18,47 a 59,3 mg/m²/dia (média 38,9 mg/m²/dia). No grupo sem mutação, a dose de 6-MP variou de 19,1 a 74,9 mg/m²/dia (média 46,08 mg/m²/dia). Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre as médias das doses de 6-MP prescritas para os grupos de pacientes com ou sem mutação (p = 0,181) (Figura 12).

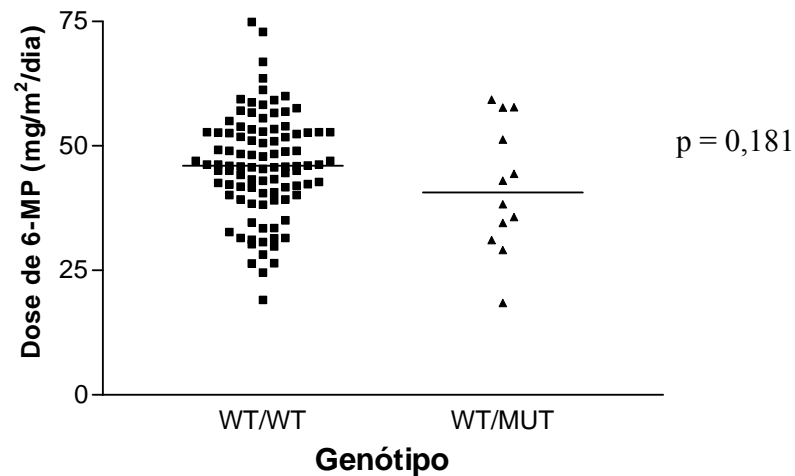


Figura 12– Associação entre média da dose de 6-MP e genótipo em 109 pacientes com LLA. WT/WT: pacientes sem mutação no gene *TPMT* – WT/MUT: pacientes heterozigotos para as mutações estudadas.

A média das doses de MTX prescritas para o grupo de todos os pacientes variou de 8,4 a 66,4 mg/m²/semana (média 23 mg/m²/semana). No grupo de pacientes com mutação no gene *TPMT*, a dose de MTX variou de 11,3 a 28 mg/m²/semana (média 19,7 mg/m²/semana) e no grupo sem mutação, a variação foi de 8,4 a 66,4 mg/m²/semana (média 23,38 mg/m²/semana).

Também não houve diferença significativa ($p = 0,1784$) entre as médias das doses de MTX prescritas para indivíduos normais e heterozigotos para as mutações (Figura 13).

Os dados referentes às doses prescritas de MTX apresentaram falhas importantes, uma vez que as anotações em prontuários médicos não seguiram um padrão uniforme. O protocolo GBTLI LLA - 99 previa que a dose de MTX administrada por via intramuscular fosse ajustada nas semanas em que o paciente realizasse a aplicação da terapia tríplice intratecal (MADIT). As condutas adotadas pelos médicos assistentes foram variadas: suspensão do MTX intramuscular, redução da dose intramuscular de acordo com a dose intratecal, aplicação intramuscular da dose habitual, ausência de anotações. Portanto, as análises referentes a essa variável foram prejudicadas.

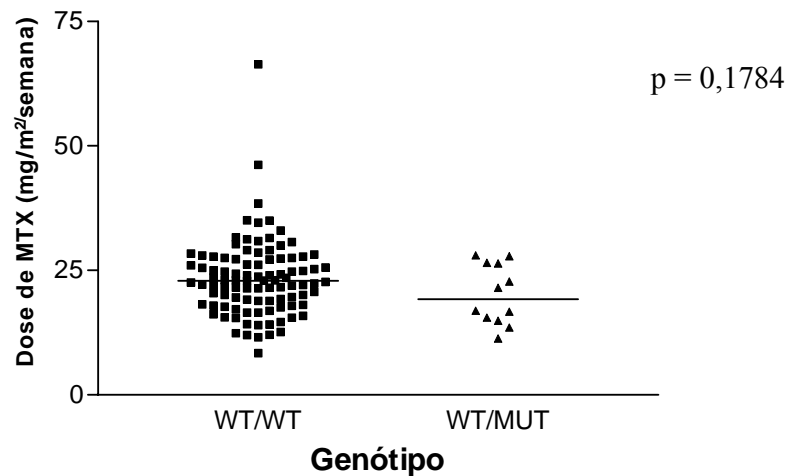


Figura 13– Associação entre média da dose de MTX e genótipo em 109 pacientes com LLA. WT/WT: pacientes sem mutação no gene *TPMT* – WT/MUT: pacientes heterozigotos para as mutações estudadas.

4.9- CONCENTRAÇÃO INTRA-ERITROCITÁRIA DOS METABÓLITOS MMP E 6-TGN *versus* GENÓTIPO

A concentração intra-eritrocitária dos metabólitos 6-TGN e MMP foi dosada em 183 amostras de sangue periférico obtidas de 36 pacientes portadores de LLA (OLIVEIRA *et al.*, 2004c). No anexo 7 estão discriminadas as doses de 6-MP e MTX prescritas para cada paciente nas últimas quatro semanas que antecederam a coleta de sangue para dosagem dos metabólitos da 6-MP e as dosagens obtidas em cada uma das 183 amostras analisadas

As concentrações intra-eritrocitárias da 6-TGN nas amostras de pacientes variaram de 2,2 a 1.934,1 pmol/ 8×10^8 hemácias (mediana 319,7; média 372,1 pmol/ 8×10^8 hemácias). Para a MMP a variação foi de 0 a 45,9 nmol/ 8×10^8 hemácias (mediana 6,3; média 8,3 nmol/ 8×10^8 hemácias).

A média das concentrações intra-eritrocitárias de 6-TGN das amostras de cada paciente variaram de 139 a 1.597,1 pmol/ 8×10^8 hemácias (mediana 329; média 367 pmol/ 8×10^8 hemácias) e para a MMP a variação foi de 0,4 a 18,8 nmol/ 8×10^8 hemácias (mediana 7; média 7,9 nmol/ 8×10^8 hemácias).

Apenas um dos 36 pacientes (identificação: 56) apresentou mutação no gene *TPMT* (*TPMT**1/*3C). Diante disso, não foi possível a realização de análises estatísticas para avaliação da relação entre o genótipo e a concentração de metabólitos da 6-MP. Neste paciente foram encontradas altas concentrações intra-eritrocitárias de 6-TGN e baixas concentrações de MMP.

Com caráter ilustrativo, foi realizada uma comparação entre as concentrações dos metabólitos observadas nos 35 pacientes que não apresentaram mutação e as concentrações observadas no paciente heterozigoto (Figuras 14 e 15).

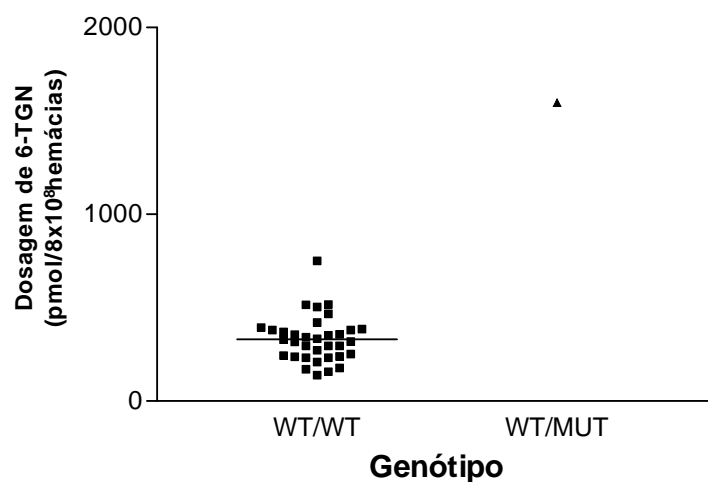


Figura 14- Comparação da dosagem de 6-TGN e genótipo em 36 pacientes com LLA. WT/WT: pacientes sem mutação no gene *TPMT* – WT/MUT: paciente heterozigoto, genótipo *TPMT**1/*3C.

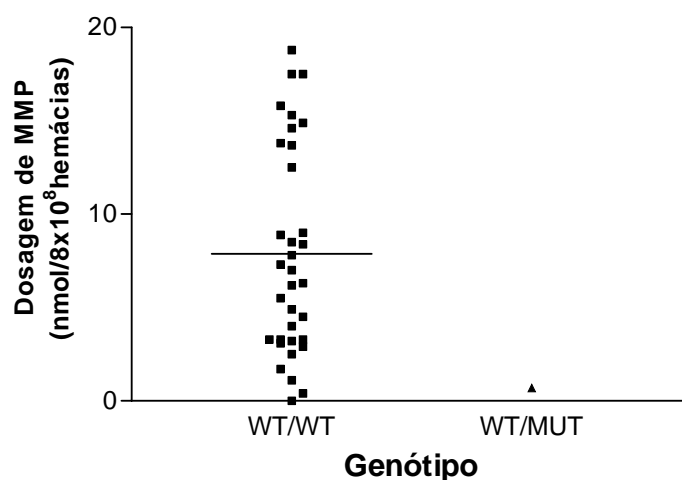


Figura 15- Comparação da dosagem de MMP e genótipo em 36 pacientes com LLA. WT/WT: pacientes sem mutação no gene *TPMT* – WT/MUT: paciente heterozigoto, genótipo *TPMT**1/*3C.

4.10- ANÁLISES DE SOBREVIDA

Os objetivos deste estudo não incluíam uma análise de sobrevida, considerando que o tamanho da amostra era insuficiente para uma avaliação adequada. No entanto, optamos pela realização de uma análise preliminar.

Dos 28 pacientes que apresentaram recidiva da doença, cinco possuíam mutação no gene *TPMT*.

A probabilidade estimada de sobrevida livre de eventos (SLE) para todo o grupo aos 8,5 anos foi de 73,4% (IC 95%:64,4% a 81,3%). A sobrevida global (SG) para todo o grupo foi de 75,1% (IC 95%: 60,8% a 84,8%).

Não foi observada diferença estatisticamente significativa na SLE quando comparados os pacientes que apresentavam mutação com aqueles sem mutação. A SLE foi de 51,4% (IC 95%: 18,2% a 77,1%) e 76,2% (IC 95%: 66,3% a 83,6%) para cada um dos grupos, respectivamente ($p = 0,06$) (Figura 16).

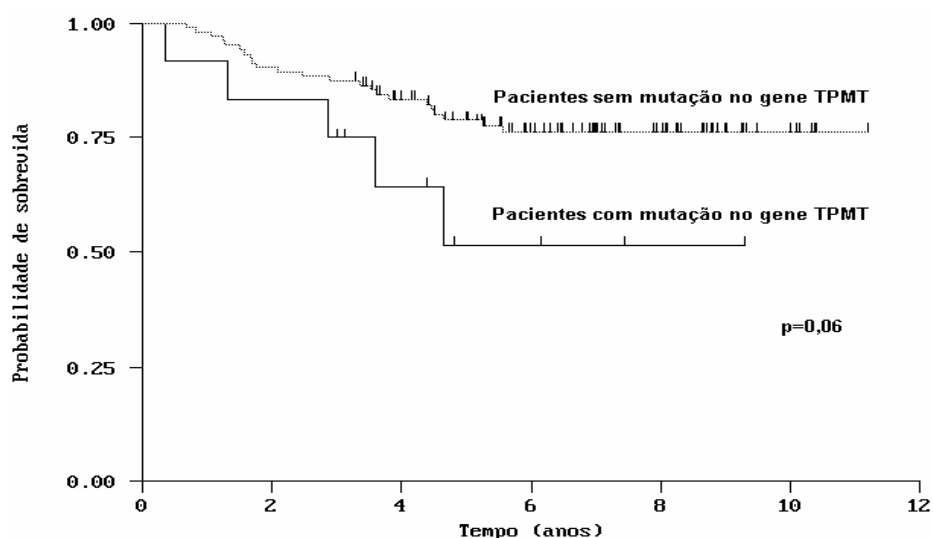


Figura 16- Curva da sobrevida livre de eventos para 115 crianças com LLA de acordo com ausência ou presença de mutação no gene *TPMT*. Pacientes sem mutação no gene *TPMT*: homocigotos para o alelo selvagem – genótipo *TPMT*1/*1*. Pacientes com mutação no gene *TPMT*: heterocigoto para alguma das mutações estudadas – genótipo *TPMT*1/*3A* ou *TPMT*1/2* ou *TPMT*1/*3C*.

Na Tabela 7 estão discriminados os dados clínicos e laboratoriais dos 12 pacientes que apresentaram mutação no gene *TPMT*.

Tabela 7- Dados clínicos e laboratoriais dos 12 pacientes com mutação no gene *TPMT*.

ID	Gênero	Idade ao diagnóstico	Contagem de leucócitos ao diagnóstico	Local da recidiva / situação atual	Mutação	Fenotipagem
17	F	2.01	157000	-/ vivo	<i>TPMT*1/*3A</i>	PRÉ-B
23	M	14.72	18800	-/ vivo	<i>TPMT*1/*3C</i>	CALLA
35	F	5.58	24900	-/ vivo	<i>TPMT*1/*3A</i>	T
44	M	4.29	6380	-/ vivo	<i>TPMT*1/*2</i>	CALLA
56	F	11.3	2200	-/ vivo	<i>TPMT*1/*3C</i>	CALLA
60	F	3.22	28000	-/ vivo	<i>TPMT*1/*3A</i>	CALLA
93	F	13.05	359000	-/ vivo	<i>TPMT*1/*3A</i>	CALLA
5	F	1.97	5700	MO / óbito	<i>TPMT*1/*3A</i>	indiferenciada
54	M	4.03	3600	Testículo / vivo	<i>TPMT*1/*3A</i>	<i>null</i>
99	M	6.36	7800	SNC / vivo	<i>TPMT*1/*3A</i>	CALLA
104	F	6.12	2800	MO / óbito	<i>TPMT*1/*3A</i>	CALLA
116	M	7.65	33200	MO / vivo	<i>TPMT*1/*3A</i>	CALLA

ID - número de identificação

5- DISCUSSÃO

O uso da quimioterapia combinada no tratamento da LLA surgiu na década de 80 como um paradigma para a cura das neoplasias disseminadas. Vários desses princípios terapêuticos foram aplicados subseqüentemente no tratamento de outros tipos de câncer. De maneira similar, a elucidação da farmacogenômica da LLA e a sua tradução em novas abordagens terapêuticas poderá servir como modelo para a otimização do tratamento de outras neoplasias (CHEOK and EVANS, 2006).

O polimorfismo genético da TPMT é um dos melhores exemplos da aplicabilidade clínica da farmacogenética. Como as tiopurinas (6-MP e 6-Tioguanina) são drogas importantes na grande maioria dos protocolos de tratamento da LLA, a análise do gene *TPMT* pode contribuir para a otimização do uso desses quimioterápicos (CHEOK and EVANS, 2006).

No presente estudo, o sistema *multiplex* de amplificação refratária a mutação (ARMS *multiplex*), descrito por ROBERTS e colaboradores (2004), foi o método escolhido para a pesquisa das mutações no gene *TPMT*. O PCR-ARMS *multiplex* é um método rápido e eficaz na detecção de diversas mutações pontuais em uma mesma reação, dispensando o uso de enzimas de restrição e o sequenciamento do DNA (NEWTON *et al.*, 1989).

Inicialmente, foram testadas as condições do PCR-ARMS *multiplex* estabelecidas por ROBERTS e colaboradores (2004), sendo necessárias modificações nas concentrações de MgCl₂, *Taq* DNA polimerase e no volume final de reação. Após a padronização, o método foi considerado de fácil execução e adequado para detectar os polimorfismos do gene *TPMT*, que definem os alelos *TPMT*2*, **3A*, **3B* e **3C*.

Foram testados dois métodos para isolamento do DNA genômico a partir de sangue total, o método fenol-clorofórmio e o *kit* DNAzol (INVITROGEN). O método fenol-clorofórmio é sabidamente mais tóxico e mais demorado. Considerando que algumas amostras estavam congeladas a -20° C, os resultados obtidos com este método foram indiscutivelmente superiores aos do *kit* DNAzol. Nas amostras congeladas não foi possível o isolamento do DNA genômico com esse *kit*. No entanto, para a incorporação da genotipagem na rotina dos protocolos de tratamento de pacientes com LLA, julgamos

importante que sejam feitas novas tentativas de padronização de métodos menos tóxicos e mais ágeis do que o fenol-clorofórmio.

O isolamento de DNA genômico a partir de concentrado de hemácias armazenado a -20°C e lâminas com esfregaço de medula óssea foi realizado com sucesso, o que propiciou a análise do genótipo de pacientes que já haviam falecido ou recebido alta hematológica.

Os objetivos iniciais do estudo previam a determinação da frequência dos alelos *TPMT**2, *3A e *3C. Não estava prevista a avaliação do alelo *TPMT**3B, uma vez que este é raro (OTTERNESS *et al.*, 1997, YATES *et al.*, 1997; SCHAEFFELER *et al.*, 2003; EICHELBAUM *et al.*, 2006; SCHAEFFELER *et al.*, 2006). Entretanto, como os iniciadores utilizados na PCR-ARMS *multiplex* possibilitam a detecção simultânea do polimorfismo dos nucleotídeos 238 G>C, 460G>A e 719A>G, que definem os alelos *TPMT**2, *TPMT**3A, *TPMT**3B e *TPMT**3C, o alelo *TPMT**3B também foi incluído nas estimativas de frequência alélica.

Na presente casuística, o alelo *TPMT**3A foi o mais frequente (3,9%), seguido pelo *TPMT**3C (0,9%), e o menos frequente foi o *TPMT**2 (0,4%). Essa distribuição de frequências é semelhante à encontrada em Caucasianos (DE LA MOUREYRE *et al.*, 1998b; HON *et al.*, 1999; McLEOD *et al.*, 1999; GANIERE-MONTEIL *et al.*, 2004; COROMINAS *et al.*, 2006) (Tabela 2).

O polimorfismo da TPMT foi estudado em dois outros trabalhos brasileiros (REIS *et al.*, 2003, BOSON *et al.*, 2003), no entanto nenhum destes teve como objetivo principal a avaliação de pacientes com LLA. Um dos estudos avaliou indivíduos saudáveis (REIS *et al.*, 2003). O outro incluiu pacientes de um hospital público, que não apresentavam diagnóstico de leucemia (BOSON *et al.*, 2003).

Nos estudos de REIS e colaboradores (2003) e BOSON colaboradores (2003) foi utilizada a PCR-RFLP alelo específica para o estudo do genótipo dos indivíduos. No presente estudo foi utilizado o PCR ARMS *multiplex*, sistema que permite amplificar simultaneamente mais de um *loci*. De acordo com ROBERTS e colaboradores (2004), o PCR AMRS *multiplex*, quando comparado com outros métodos, é uma opção simples, rápida, precisa e com boa relação custo-benefício.

Os resultados encontrados nos dois trabalhos brasileiros foram diferentes dos observados na presente casuística. No estudo realizado pelos pesquisadores do Instituto Nacional do Câncer, o alelo mais freqüente foi o *TPMT*3C* (REIS *et al.*, 2003). Os pesquisadores mineiros observaram maior freqüência do alelo *TPMT*2* (BOSON *et al.*, 2003) (Tabela 8).

Tabela 8 - Freqüência dos alelos *TPMT*2, *3A, *3B, *3C, *5 e *6* em três estudos brasileiros

Estudo	<i>TPMT*2</i> (%)	<i>TPMT*3A</i> (%)	<i>TPMT*3B</i> (%)	<i>TPMT*3C</i> (%)	<i>TPMT*5</i> (%)	<i>TPMT*6</i> (%)	N #
Presente casuística	0,4	3,9	0	0,9	¥	¥	116
Boson <i>et al.</i> , 2003	2,2	1,5	0,2	1	0	0	202
Reis <i>et al.</i> , 2003 (Euro- descendentes)	0,76	2,03	0	2,54	¥	¥	-
Reis <i>et al.</i> , 2003 (miscigenados)	0,60	1,81	0	1,80	¥	¥	-
Reis <i>et al.</i> , 2003 (Afro- descendentes)	0	0	0	0	¥	¥	-

N = Número de pacientes

¥ Nestes estudos a freqüência dos alelos *TPMT*5 e *6* não foi avaliada

- número não informado no artigo

A freqüência e o padrão de distribuição dos principais alelos mutantes da *TPMT* variam de acordo com o grupo étnico estudado. Por exemplo, entre os Caucasianos, o alelo mutante mais freqüente é o *TPMT*3A*. No sudoeste asiático (Índia e Paquistão) observa-se uma menor freqüência de alelos mutantes e o alelo predominante é o *TPMT*3A* (COLLIE-DUGUID *et al.*, 1999). No leste e oeste da África a freqüência de alelos mutantes é

semelhante à encontrada entre os Caucasianos, mas o alelo mutante mais freqüente é o *TPMT*3C* (McLEOD *et al.*, 1999). O alelo *TPMT*3C* também é o mais freqüente nas populações Afro-Americana (HON *et al.*, 1999), Chinesa (COLLIE-DUGUID *et al.*, 1999; ZHANG *et al.*, 2006) e Japonesa (HIRATSUKA *et al.*, 2000; OKADA *et al.*, 2005). O alelo *TPMT*2* não foi o de maior freqüência em nenhum dos grupos étnicos estudados e parece ter sua ocorrência restrita em Caucasianos (COLLIE-DUGUID *et al.*, 1999) (Tabela 2).

No estudo de REIS e colaboradores (2003), os indivíduos foram divididos em três grupos de acordo com a cor da pele e a ancestralidade declaradas pelo próprio participante. A freqüência dos alelos *TPMT*3A* e *TPMT*3C* não foi significativamente diferente quando comparados os três subgrupos ($p = 0,88$). A freqüência do alelo *TPMT*2* observada na população do estudo, nos Euro-descendentes e no grupo miscigenado foi aproximadamente duas a três vezes maior do que a previamente relatada para Caucasianos e Afro-Americanos. Os autores atribuíram esses achados à miscigenação racial e ao alto índice de mistura genética que caracterizam a população brasileira.

Entretanto, PARRA e colaboradores (2003) e PIMENTA e colaboradores (2006) demonstraram, através de marcadores moleculares, que cor da pele determinada por avaliação física é um método insatisfatório para predizer a ancestralidade em brasileiros.

O Brasil tem uma das populações mais heterogêneas no mundo. Essa heterogeneidade é resultado de cinco séculos de cruzamentos interétnicos, envolvendo indivíduos provenientes dos continentes Europeu, Africano, Asiático e Americano. Essa heterogeneidade tem implicações importantes nos estudos de farmacogenética, pois dificulta a extrapolação de dados derivados de grupos étnicos bem definidos para a maioria da população brasileira (CARVALHO-SILVA *et al.*, 2001).

Estudos feitos no Brasil concluíram que os brasileiros possuem a impressão genética de ancestrais Europeus na linhagem materna (ALVES-SILVA *et al.*, 2000) e paterna (CARVALHO-SILVA *et al.*, 2001). Isto sugere que os alelos *TPMT* mais freqüentes em Caucasianos (*TPMT*3A*, *2, *3C) deveriam ser encontrados em brasileiros.

No estudo de REIS e colaboradores (2003), a genotipagem e a fenotipagem foram combinadas para avaliação do polimorfismo da TPMT. Os resultados do estudo demonstraram que a ausência de mutações estava relacionada com alta atividade da enzima

TPMT. O único indivíduo com baixa atividade enzimática apresentava dois alelos mutantes, com genótipo *TPMT*3A/TPMT*3C*. Um alelo mutante foi detectado em 86,6% dos indivíduos com atividade enzimática intermediária. O nível de correspondência entre genótipo e fenótipo estava dentro da variação (78 a 95%) encontrada em outras populações.

BOSON e colaboradores (2003) avaliaram, também, a concordância entre fenótipo e genótipo em dois pacientes com LLA que apresentaram mielotoxicidade importante, e que tiveram a dose de 6-MP prescrita na fase de manutenção reduzida para um terço da dose inicial. Uma das crianças era heterozigota no alelo *TPMT*2* e outra no *TPMT*3C*.

O presente estudo teve como um de seus objetivos correlacionar o genótipo com dados clínicos e laboratoriais obtidos durante a fase de manutenção da quimioterapia.

Os resultados referentes a essas análises apresentam algumas limitações em decorrência do tamanho da amostra e do pequeno número de pacientes submetidos à dosagem de metabólitos da 6-MP. Mesmo considerando que as principais variantes alélicas foram avaliadas no presente estudo, é importante ressaltar que pacientes portadores de outras mutações no gene *TPMT* podem não ter sido identificados. Todas as mutações encontradas foram observadas em heterozigose com o alelo selvagem, não havendo, portanto, possibilidade de avaliar as características clínicas e laboratoriais em pacientes com deficiência de TPMT. A coleta dos dados clínicos e laboratoriais foi retrospectiva, o que dificultou a obtenção de alguns dados, principalmente aqueles relacionados às doses prescritas de MTX. A avaliação da atividade da TPMT não foi realizada. Esse dado possibilitaria uma melhor avaliação da correlação genótipo/fenótipo.

Existem evidências de que a contagem de leucócitos e neutrófilos seria uma forma indireta de se avaliar a intensidade da quimioterapia. Parece haver uma correlação significativa entre a elevação da concentração de 6-TGN e a queda das contagens de leucócitos, neutrófilos, hemácias e plaquetas. Contagens elevadas de leucócitos estariam associadas a menor exposição a concentrações adequadas de 6-MP e/ou MTX (CHESSELS, 2000).

De acordo com a literatura, seria esperado que os indivíduos portadores de mutação no gene *TPMT* apresentassem contagens mais baixas de leucócitos e neutrófilos durante a fase de manutenção da quimioterapia, do que indivíduos portadores do alelo selvagem. Os pacientes portadores da deficiência da TPMT podem apresentar quadros graves de

mielotoxicidade durante tratamento com doses habituais de tiopurinas. Por sua vez, os pacientes heterozigotos apresentam risco intermediário de toxicidade medular (KRYNETSKI & EVANS, 1999; McLEOD *et al.*, 2000).

No entanto, no presente estudo não foram observadas diferenças significativas nas medianas da contagem de leucócitos ($p = 0,48$) e neutrófilos ($p = 0,59$), quando comparados os grupos de pacientes com e sem mutação.

Outros pesquisadores também não observaram correlação significativa entre a presença de mutações nos alelos *TPMT*, ou concentrações elevadas de 6-TGN, e a contagem de leucócitos e neutrófilos (INNOCENTI *et al.*, 2000; COLOMBEL *et al.*, 2000). Esses pesquisadores sugeriram que o efeito citotóxico da 6-MP não depende apenas da formação de 6-TGN (INNOCENTI *et al.*, 2000) e que outros fatores podem interferir na contagem de leucócitos, tais como tratamento simultâneo com várias drogas (COLOMBEL *et al.*, 2000) e não adesão ao tratamento (OLIVEIRA *et al.*, 2004b).

Apesar da necessidade de estudos prospectivos para se estabelecer o benefício da leucopenia, através do ajuste das doses de MTX e 6-MP para o máximo tolerado, os resultados de diferentes estudos indicam vantagem clínica em serem mantidas baixas contagens de leucócitos e neutrófilos durante a fase de manutenção do tratamento, o que poderia contribuir para um melhor prognóstico destes pacientes (SCHMIEGELOW & PULCZYNSKA 1990a; HAYDER *et al.*, 1992).

De acordo com o relatório do Sétimo *Workshop* Internacional sobre a LLA, durante a fase de manutenção da quimioterapia as doses de 6-MP e MTX deveriam ser ajustadas para que a contagem de leucócitos fosse mantida abaixo de $3.000/\text{mm}^3$. Esse nível parece estar relacionado como uma redução no risco de recidiva. Os medicamentos só deveriam ser suspensos ou ter suas doses reduzidas caso a contagem de leucócitos estivesse abaixo de $1.500/\text{mm}^3$, a contagem de neutrófilos fosse inferior a 300-500 células/ mm^3 ou a contagem de plaquetas estivesse abaixo de $50.000/\text{mm}^3$ (ARICÓ, *et al.*, 2005).

O protocolo do GBTLI LLA - 93 preconizava que a contagem total de leucócitos fosse mantida entre 2.000 células/ mm^3 e 3.000 células/ mm^3 . No protocolo do GBTLI LLA - 99 essa contagem deveria permanecer entre 1.500 e 3.000 células/ mm^3 . Na presente casuística, que inclui pacientes tratados de acordo com esses dois protocolos, as medianas das contagens de leucócitos e neutrófilos para todo o grupo foram de 3.500 células/ mm^3 e

1.674 células/mm³, respectivamente. Essas medianas foram consideradas muito elevadas, sugerindo que algumas crianças poderiam ter recebido doses mais altas de 6-MP e MTX do que as prescritas.

Também era esperado que o grupo de pacientes com mutação no gene *TPMT* apresentasse períodos mais prolongados, ou mais freqüentes, de interrupção da quimioterapia, uma vez que as doses de 6-MP não foram ajustadas em função do genótipo. O polimorfismo genético da *TPMT* tem grande influência na tolerância aos regimes terapêuticos que contêm 6-MP, mesmo em pacientes heterozigotos (RELLING *et al.*, 1999a; McLEOD *et al.*, 2000). No entanto não foi observada associação entre tempo de interrupção da quimioterapia e genótipo. É interessante relatar que o paciente que apresentou maior freqüência de dias de interrupção da quimioterapia (46% do tempo total de duração da fase de manutenção) apresentava mutação, com genótipo *TPMT*1/TPMT*3A* (Figura 11 do item 4.7 dos resultados).

A interrupção da quimioterapia poderia influenciar o prognóstico da LLA de duas formas. As interrupções muito freqüentes e prolongadas poderiam ser causa de menor exposição às drogas, aumentando o risco de recidiva. Por sua vez, a tolerância à dose “plena” dos quimioterápicos por períodos prolongados, sem sinais mínimos de mielotoxicidade ou disfunção orgânica, também poderia ser um reflexo de exposição sistêmica insuficiente. Esta exposição insuficiente poderia ser decorrente tanto de prescrição de doses inadequadas, como de falhas na adesão ao tratamento (RELLING *et al.* 1999b).

Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre a média das doses de 6-MP prescritas para os grupos de pacientes com e sem mutação ($p = 0,181$). Em ambos os grupos a média das doses prescritas foi inferior à dose de 6-MP preconizada no protocolo.

É interessante observar que a média das doses prescritas no grupo de pacientes com mutação variou de 18,5 a 59,3 mg/m²/dia e que quatro pacientes receberam doses de 6-MP acima da preconizada. Dos doze pacientes nos quais foi detectada mutação, oito apresentaram a média das doses de 6-MP prescritas durante a fase de manutenção inferior à dose preconizada no protocolo (50 mg/m²/dose). A redução variou de 11% a 63% da dose prescrita.

Portanto, vários indícios encontrados no presente estudo sugerem que a intensidade da quimioterapia pode não ter sido suficiente para se alcançar uma mielossupressão adequada, especialmente no grupo de pacientes com mutação do gene da TPMT: a) mediana da contagem de leucócitos e neutrófilos durante o tratamento de manutenção acima da preconizada pelo protocolo; b) tempo de interrupção da quimioterapia semelhante nos dois grupos; c) média das doses prescritas de 6-MP abaixo da preconizada pelo protocolo.

Alguns fatores podem ter contribuído para esses resultados como falhas na adesão dos pacientes ao tratamento, prescrição médica inadequada, fatores relacionados à biodisponibilidade e ao metabolismo da 6-MP, desenvolvimento de intolerância à incorporação de bases fraudulentas no DNA (COULTHARD *et al.*, 1998; RELING *et al.*, 1999a; McLEOD *et al.*, 2000). Um outro fator importante é a existência de variabilidade na atividade da TPMT em pacientes heterozigotos (McLEOD *et al.*, 2000). Existem relatos de pacientes heterozigotos para os alelos *TPMT**3A, *9 e *19 que apresentavam atividade enzimática comparável à da proteína normal (HAMDAN-KHALIL *et al.*, 2005; DE LA MOUREYERE *et al.*, 1998b; SCHAEFFELER *et al.*, 2004).

Como relatado em outras secções deste estudo, existe uma correlação inversa entre atividade da TPMT e concentração de 6-TGN. Os pacientes portadores da deficiência da enzima TPMT apresentam concentrações intra-eritrocitárias de 6-TGN significativamente mais altas (RELING *et al.*, 1999b), e níveis de MMP significativamente inferiores (GILISSEN *et al.*, 2007), aos observados em homozigotos para alta atividade da enzima TPMT (*wild type*). Os pacientes heterozigotos, ou seja, portadores de atividade enzimática intermediária, apresentam concentrações intermediárias desses metabólitos (RELING *et al.*, 1999a).

Trinta e seis pacientes incluídos neste estudo haviam sido submetidos à dosagem de metabólitos da 6-MP (6 TGN e MMP). Apenas um desses indivíduos apresentava mutação no gene *TPMT*, apresentando o genótipo *TPMT**1/*3C. Portanto, não foi possível a realização de análises estatísticas referentes a esses achados. O paciente citado apresentava altas concentrações intra-eritrocitárias de 6-TGN e baixas concentrações de MMP (Figuras 14 e 15). A média das doses de 6-MP prescritas para esse indivíduo durante a fase de

manutenção foi correspondente a dois terços da dose preconizada no protocolo de tratamento.

Os resultados do presente estudo não mostraram diferença significativa na SLE, quando comparados os grupos de pacientes com e sem mutação no gene *TPMT*. Como citado anteriormente, parece razoável supor que a intensidade da quimioterapia prescrita para ambos os grupos não foi suficiente para se alcançar uma mielossupressão adequada. Isso poderia explicar porque não se encontraram diferenças significativas no prognóstico dos grupos com e sem mutação do gene da *TPMT*. No entanto, deve ser ressaltado que os resultados dessas análises também podem ter sido comprometidos pelo tamanho relativamente pequeno da amostra.

A preocupação com a hipótese de que a intensidade da quimioterapia poderia afetar o prognóstico das crianças portadoras de LLA não é recente. Nas últimas décadas diversos autores apresentaram estudos que chamavam a atenção para as variações interindividuais no metabolismo da 6-MP e do MTX, principalmente quando administrados por via oral. Crianças recebendo doses aparentemente semelhantes de 6-MP, quando calculadas de acordo com a superfície corporal, poderiam estar sistemicamente expostas a quantidades substancialmente diferentes da medicação. A preocupação subjacente a essas constatações é a de que crianças expostas a quantidades menores de quimioterapia possam estar mais sujeitas a recidivas medulares (SCHMIEGLOW *et al.*, 2003).

Os resultados de diferentes estudos reforçam a necessidade do uso de doses máximas de 6-MP, principalmente nos indivíduos com alta atividade da enzima *TPMT*, evitando-se, contudo, que a toxicidade seja tão intensa que leve a interrupções prolongadas da quimioterapia, comprometendo a intensidade da dose total e, conseqüentemente, o prognóstico dos pacientes (RELLING *et al.*, 1999b).

No *St Jude Children's Research Hospital*, importante centro de pesquisa e tratamento das neoplasias na infância, as doses de 6-MP prescritas durante o tratamento da LLA são individualizadas de acordo com a atividade da *TPMT*, a determinação das concentrações dos metabólitos das tiopurinas e a tolerância clínica. Essa estratégia é utilizada para o ajuste das doses de pacientes portadores de atividade da *TPMT* intermediária ou baixa, para o aconselhamento de pacientes com suspeita de não adesão ao tratamento devido a baixas concentrações de metabólitos da 6-MP, e no aumento das doses

prescritas para pacientes que mantêm contagens de leucócitos persistentemente elevadas. Os pesquisadores acreditam que dessa forma é possível atenuar a toxicidade relacionada ao uso das tiopurinas sem comprometer a eficácia do tratamento (RELLING *et al.*, 2006)

DOKMANOVIC e colaboradores (2006), em estudo no qual um dos objetivos era avaliar a relevância do estudo do polimorfismo da TPMT no manejo de crianças com LLA, concluíram que a realização da genotipagem antes do início do tratamento com tiopurinas parece justificada, pois possibilitaria que a toxicidade do tratamento nos portadores de mutação no gene *TPMT* fosse minimizada com o uso de doses reduzidas de 6-MP durante a fase de manutenção da quimioterapia.

Entre os principais grupos para tratamento da LLA infantil, apenas os grupos do Reino Unido (MRC/UK), dos países nórdicos (NOPHO) e o grupo americano do *St Jude Children's Research Hospital* utilizam a avaliação da atividade da TPMT de forma rotineira como um dos parâmetros para ajuste das doses de 6-MP em indivíduos heterozigotos e homozigotos para a deficiência da enzima TPMT. Os grupos alemão (BFM), holandês (DCOG) e europeu (EORTC) realizam a avaliação da atividade enzimática apenas em pacientes com intolerância ao tratamento (ARICÓ *et al.*, 2005).

Em estudo europeu, incluindo médicos do Reino Unido, Alemanha e Holanda, foi observada relutância por parte dos entrevistados em utilizar testes farmacogenéticos na sua prática clínica. Cinquenta e três por cento dos médicos que empregavam tratamentos com drogas tiopurinas não utilizavam testes farmacogenéticos, 35% usavam estes testes, mas não em todos os pacientes. Quando foram questionados a respeito de barreiras para a utilização de testes para avaliação da atividade da TPMT, 25% dos entrevistados responderam que a utilidade clínica desses testes é baixa e 50% consideraram que são de grande utilidade. É importante destacar que os resultados do estudo apresentam limitações, uma vez que um pequeno número de questionários foi respondido. Dos 34 questionários respondidos, somente 16 foram completamente preenchidos (WOELDERINK *et al.*, 2006).

A relação custo-benefício da genotipagem, realizada antes do início do tratamento de crianças com LLA, foi avaliada em estudo que envolveu quatro países europeus (Alemanha, Holanda, Reino Unido e Irlanda). Os cálculos foram baseados na prevalência da deficiência da TPMT, taxas de mielossupressão induzida pelas tiopurinas em indivíduos com deficiência enzimática e custos das internações relacionadas a mielossupressão. Os

autores concluíram que a relação custo-benefício é favorável, indicando que a genotipagem deve ser seriamente considerada como parte integral dos cuidados de saúde necessários para o início da terapia com tiopurinas (MARLE *et al.*, 2006).

Apesar dos testes para determinação da atividade da TPMT estarem disponíveis em vários centros, esses exames ainda não foram incluídos na rotina de avaliação dos pacientes submetidos aos complexos regimes de tratamento da LLA. Parece haver um certo grau de ceticismo ou, talvez, de desconhecimento a respeito de sua utilidade (DAVIES, 2006).

Determinações da atividade da TPMT em eritrócitos ou a determinação do genótipo através de estudos do DNA têm sido sugeridas como uma forma segura de se evitar a toxicidade desses medicamentos, obtendo-se o melhor resultado terapêutico possível com o uso da 6-MP (ANDERSEN *et al.*, 1998). Diante dos resultados do presente estudo e dos dados da literatura, é possível concluir que a genotipagem é uma estratégia importante para detectar, prospectivamente, as deficiências de TPMT e minimizar os riscos de toxicidade do tratamento, contribuindo para fundamentar uma melhor abordagem diagnóstica e terapêutica, com repercussões na sobrevida e na qualidade de vida dos pacientes com LLA (COULTHARD & HOGARTH, 2005).

5.1 - CONSIDERAÇÕES FINAIS

O tratamento da LLA, assim como o de outras neoplasias, é complexo e envolve o uso de vários quimioterápicos com diferentes mecanismos de ação. A resposta à terapêutica depende de diversos fatores, incluindo características das células neoplásicas, presença de comorbidades, adesão ao tratamento e o protocolo de tratamento empregado (DAVIES, 2006).

Em consequência do uso de múltiplas drogas, diferentes genes podem estar envolvidos na resposta ao tratamento, podendo haver inclusive interações entre os mesmos.

Torna-se cada vez mais importante um melhor entendimento de como esses múltiplos genes podem influenciar o resultado do tratamento. São necessários modelos farmacogenéticos poligênicos para que se possa estabelecer com maior segurança estratégias terapêuticas adequadas e individualizadas.

De acordo com DAVIES (2006), a medicina personalizada “para todos” não parece estar em um horizonte imediato, mas em um alvo ainda distante. No entanto, enquanto os estudos nesse sentido avançam, é importante que seja determinada a aplicabilidade e a importância clínica de estratégias que comprovadamente influenciam o resultado do tratamento da LLA, como a determinação do genótipo *TPMT*.

As informações obtidas neste estudo sobre os vários aspectos relacionados ao polimorfismo do gene *TPMT* podem ser utilizadas em benefício dos pacientes. A incorporação da genotipagem à rotina de acompanhamento dos pacientes tratados no Serviço de Hematologia do Hospital das Clínicas da UFMG poderá contribuir para uma melhor abordagem diagnóstica e terapêutica.

Como vários indícios encontrados no presente estudo sugerem que a intensidade da quimioterapia pode não ter sido suficiente para se alcançar uma mielossupressão adequada, principalmente no grupo de pacientes com mutação do gene *TPMT*, a genotipagem poderia ser uma ferramenta auxiliar na otimização das doses de 6-MP. Também seria útil na avaliação de casos com suspeita de falha na adesão ao tratamento.

É importante que sejam elaborados programas e intervenções com a equipe assistencial e com a família/criança, tendo como base uma abordagem mais ampla para o problema da não adesão ao tratamento. Especial atenção deverá ser dada à questão da adesão médica aos protocolos de tratamento.

Por fim, para complementação deste estudo, os pesquisadores pretendem ampliar o tamanho da população estudada e o tempo de seguimento dos pacientes, o que possibilitará a realização de análises de sobrevida mais adequadas.

6- CONCLUSÕES

6.1 - O sistema PCR-ARMS, descrito por ROBERTS e colaboradores (2004), mostrou ser uma técnica rápida e eficaz na detecção de quatro mutações pontuais em reações alelo específicas isoladas e em *multiplex*.

A frequência dos alelos *TPMT*2* (1/232; 0,4%), **3A* (9/232; 3,9%), **3B* (nenhum alelo; 0%) e **3C* (2/232; 0,9%) na população estudada foi semelhante à encontrada em Caucásianos. Nessas populações o *TPMT*3A* é a variante alélica mais freqüente. No entanto, os resultados diferiram dos obtidos em dois outros estudos brasileiros, nos quais os alelos *TPMT*2* e *TPMT*3C* foram os mais freqüentes. Essa diferença pode estar relacionada à miscigenação racial que caracteriza a população brasileira.

Todas as mutações observadas estavam em heterozigose com o alelo selvagem (*wild type*).

6.2- Não houve diferenças significativas nas medianas da contagem de leucócitos e de neutrófilos, nos grupos de pacientes com e sem mutação. Também o tempo de interrupção da quimioterapia de manutenção foi semelhante nos dois grupos. Como, ainda, a média das doses prescritas de 6-MP situou-se abaixo da dose preconizada pelo protocolo em ambos os grupos e a mediana da contagem de leucócitos e neutrófilos durante o tratamento de manutenção ficou acima da preconizada pelos protocolos de tratamento, parece razoável supor que a intensidade da quimioterapia prescrita para ambos os grupos não foi suficiente para se alcançar uma mielossupressão adequada. Isso explicaria porque não se encontraram diferenças significativas no prognóstico dos grupos com e sem mutação do gene da TPMT.

6.3- Em apenas um dos 36 pacientes nos quais foi realizada a dosagem dos metabólitos da 6-MP (6-TGN e MMP) foi detectada mutação num dos alelos do gene *TPMT* (*TPMT*1/*3C*). Portanto, não foi possível a realização de análises estatísticas para avaliação da relação entre o genótipo e a concentração de metabólitos da 6-MP. O paciente por ser heterozigoto, teria uma atividade da TPMT menor que as demais. Em vista disso, seriam esperadas, e se confirmaram, altas concentrações intra-eritrocitárias de 6-TGN e baixas de MMP.

6.4- A genotipagem é uma estratégia importante para detectar, prospectivamente, as deficiências de TPMT o que permitiria adequar e individualizar a dose de 6-MP,

minimizando os riscos de toxicidade e mantendo a eficácia do tratamento. A incorporação da genotipagem à rotina de acompanhamento dos pacientes tratados no Serviço de Hematologia do Hospital das Clínicas da UFMG poderá contribuir para uma melhor abordagem diagnóstica e terapêutica, com prováveis repercussões na sobrevida e na qualidade de vida dos pacientes.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alves S, Amorim A, Ferreira F, Prata MJ. Influence of the variable number of tandem repeats located in the promoter region of the thiopurine methyltransferase gene on enzymatic activity. *Clin Pharmacol Ther* 2001; 70: 165-174.

Alves-Silva J, Santos MSS, Guimarães PEM, Ferreira ACS, Bandelt HJ, Pena SDJ, Prado VF. The ancestry of Brazilian mtDNA lineages. *Americ J Genet* 2000; 67: 444-461.

Andersen JB, Szumlanski C, Weinshilboum RM, Schmiegelow K. Pharmacokinetics, dose adjustments, and 6-mercaptopurine/ methotrexate drug interactions in two patients with thiopurine methyltransferase deficiency. *Acta Paediatr* 1998; 87:108-11.

Aricó M, Baruchel A, Bertrand Y, Biondi A, Conter V, Éden T, Gardner H, Gaydon P et al. The Seventh International Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia Workshop Report: Palermo, Italy, January 29-30. *Leukemia* 2005; 19: 1145-1152.

Arndt CAS, Balis, McCully CL, Jeffries SL, Doherty K, Murphy R et al. Bioavailability of low-dose vs high-dose 6- mercaptopurina. *Clinic Pharmacol Ther* 1988; 43: 588-591.

Balis FM, Holcenberg JS, Poplack DG, Jeffrey G, Sather JGHN, Murphy RF et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of oral methotrexate and mercaptopurina in children with lower risk acute lymphoblastic leukemia: a joint children's cancer group and pediatric oncology branch study. *Blood* 1998; 92: 3569-3577.

Bene MC, Castoldi G, Knapp W, Ludwig WD, Matutes E, Orfao A, van't Veer MB. Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL).1:*Leukemia*: 1995; 10: 1783-1786.

Bennett JM; Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, Sultan C. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol.* 1976; 33: 451-458.

Beutler E. The treatment of acute leukemia: past, present, and future. *Leukemia* 2001; 15: 658-61.

Boson WL, Romano-Silva MA, Correa F, Teixeira-Vidigal PV, De Marco L. Thiopurine methyltransferase polymorphisms in a brazilian population. *Pharmacogenomics J* 2003; 3: 178-82.

Brouwer C, Abreu RA de, Keizer-Garritsen, Lambooy LHJ, Ament K, Riet PGH ter et al. Thiopurine methyltransferase in acute lymphoblastic leukaemia: biochemical and molecular biological aspects. *Eur J Cancer* 2005; 41: 612-623.

Carvalho-Silva DR, Santos FR, Rocha J, Pena SDJ. The Phylogeography of Brazilian Y-Chromosome Lineages. *Amer J Genet* 2001; 68: 281-286.

Cheok MH and Evans WE. Acute lymphoblastic leukaemia: a model for the pharmacogenomics of cancer therapy. *Nat Rev* 2006; 6: 117-129.

Chessels JM. Risk analysis in acute lymphoblastic leukemia: problems and pitfalls. *Eur J Cancer* 1995; 31A: 1656-1659.

Chessels JM. Recent advances in management of acute leukemia. *Arch Dis Child* 2000; 82: 438-42.

Collie-Duguid ESR, Pritchard SC, Powrie RH, Sludden J, Collier DA, Li T, McLeod HL. The frequency and distribution of thiopurine methyltransferase alleles in Caucasian and Asian populations. *Pharmacogenetics* 1999; 9: 37-42.

Colombel JF, Ferrari N, Debuysere H, Marteau P, Gendre JP et al. Genotypic analysis of thiopurine S-methyltransferase in patients with Crohn's disease and severe myelosuppression during azathioprine therapy. *Gastroenterology* 2000; 118: 1025-1030.

Corominas H, Dormenech M, del Rio E, Gich I, Domingo P, Baiget M. Frecuencia y distribución de las variantes alélicas Del gen de la tiopurina S-metiltransferasa em distintos grupos étnicos españoles. *Méd Clin* 2006; 11: 410-412.

Coulthard SA, Howell C, Robson J, Hall AG. The relationship between thiopurine methyltransferase activity and genotype in blasts from patients with acute leukemia. *Blood* 1998; 92: 2856-62.

Coulthard SA, Rabello C, Robson J, Howell C, Minto L, Middleton PG et al. A comparison of molecular and enzyme-based assays for the detection of thiopurine methyltransferase mutations. *Br J Haematol* 2000; 110: 599-604.

Coulthard SA, Hogarth LA, Little M, Matheson EC, Redfern CPF, Minto L, Hall AG. The effect of thiopurine methyltransferase expression on sensitivity to thiopurine drugs. *Mol Pharmacol* 2002; 62: 102-109.

Coulthard S, Hogarth L. The thiopurines: an update. *Invest new drugs* 2005; 23(6): 523-532.

Davies SM. Pharmacogenetics, pharmacogenomics and personalized medicine: are we there yet? *Hematology* 2006; 111-117.

De la Moureyere CSV, Debuysere H, Sabbagh N, Marez D, Vinner E, Chevalier ED, Guidice JMO, Broly F. Detection of known and new mutations in the S-methyltransferase

gene by single-strand conformation polymorphism analysis. *Hum mutat* 1998 (a); 12: 177-185

De la Moureyere CSV, Debuysere H, Mastain B, Vinner E, Marez D, Sabbagh N, Lo Guidice JMO et al. Genotypic and phenotypic analysis of the thiopurine S-methyltransferase gene (TPMT) in a European population. *Br J Pharmacol* 1998 (b); 125: 879-887.

De la Moureyere CSV, Debuysere H, Fazio F, Sergetn E, Bernard C, Sabbagh N, Marez D, Lo Guidice JM, D'halluin JC, Broly F. Characterization of a variable number tandem repeat region in the thiopurine S-methyltransferase gene promoter. *Pharmacogenetics* 1999; 9: 189-198.

Dervieux T, Boulieu R. Simultaneous determination of 6-thioguanine and methyl 6-mercaptopurine nucleotides of azathioprine in red blood cells by HPLC. *Clin Chem* 1998; 44:551-5.

Dervieux T, Brener TL, Hon YY, Zhou Y, Hancock ML, Sandlund JT, Rivera GK, Ribeiro RC, Boyett JM, Pui CH, Relling MV and Evans WE. De novo purine synthesis inhibition and antileukemic effects of mercaptopurina alone or in combination with methotrexate in vivo. *Blood* 2002; 100 (4): 1240-1247.

Dokmanovic L, Urosevic J, Janic D, Jovanovic N, Petrucev B, Tosic N, Pavlovic S. Analysis of Thiopurine S-methyltransferase Polymorphism in the population of Serbia and Montenegro and Mercaptopurine therapy tolerance in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Ther Drug Monit* 2006; 28: 800-806.

Dubinsky MC, Lamothe S, Yang HY, Targan SR, Sinnett D, Theoret Y et al. Pharmacogenomics and metabolite measurement for 6-mercaptopurine therapy in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2000; 118: 705-713.

Du Bois D, Du Bois E. A formula to estimate the approximate surface area if height and weight be known. *Arch Intern Medical*, 1916; 17: 863-871.

Eichelbaum M, Sundberg MI, Evans WE. Pharmacogenomics and individualized drug therapy. *Annu. Rev. Med.* 2006; 57: 119-137.

Falcão RP. Leucemia Linfóide aguda em adultos e crianças. Características morfológicas e imunofenotípicas. *Ser Monogr Esc Brás Hematol* 2002; 9: 25-35.

Ferrazzini G, Kein J, Sulh H, Chung D, Griesbrecht E, Koren G. Interaction between trimethoptim-sulfametoxazole and methotrexate in children with leukemia. *J Pediatr* 1990; 117: 826-826.

Ganiere-Monteil C, Medard Y, Lejus C, Bruneau B, Pineau A, Fenneteau O, Bourin M, Jacqz-Aigrain E. Phenotype and genotype for thiopurine methyltransferase activity in the French Caucasian population: impact of age. *Eur J Clin Pharmacol* 2004; 60: 89-96.

Gilissen LPL, Deryks LJJ, Verhaeven HMJH, Bierau K, Hooymans PM, Hommes DW, Engels LGJB. Pancytopenia due to high 6-methylmercaptopurine levels in a 6-mercaptopurine treated patient with Crohn's disease. *Dig liver dis* 2007; 39: 182-186.

Gisbert JP, Gomollon F, Cara C, Luna M, Gonzalez-Lama Y, Pajares JM, Mate J, Guijarro LG. Thiopurine methyltransferase activity in Spain: a study of 14545 patients. *Dig Dis Sci.* 2007; 52: 1262-1269.

Giverhaug T, Loennechen T, Aarbakke J. The interaction of 6-mercaptopurine (6-MP) and methotrexate (MTX). *Gen Pharmacol* 1999; 33: 341-6.

Hamdan-Khalil R, Allorge D, Lo-Guidice JM, Cauffiez, Chevalier D, Spire C, Houndret N et al., In vitro characterization of four novel non-functional variants of the thiopurine S-methyltransferase. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 309: 1005-1010.

Hamdan-Khalil R, Gala JL, Allorge D, Lo-Guidice JM, Horsmans Y, Houndret N, Broly F. Identification and functional analysis of two rare allelic variants of the thiopurine S-methyltransferase gene, *TPMT*16* and *TPMT*19*. *Biochem Pharmacol* 2005; 69: 525-529.

Henegariu O, Heerema NA, Dlouhy SR, Vance GH, Vogt PH. Multiplex PCR: Critical Parameters and Setp-by-Step Protocol. *Biotechniques* 1997; 23: 504-511.

Hayder S, Bjork O, Nilsson B. Relapse factors during maintenance therapy of acute lymphoblastic leukemia in children. *Pediatric Hematology Oncology* 1992; 9: 21-27.

Hiratsuka M, Inoue T, Omori F, Agatsuma Y, Mizugaki M. Genetic analysis of thiopurine methyltransferase polymorphism in a Japanese population. *Mutat Res* 2000; 448: 91-95.

Hon YY, Fessing MY, Pui CH, Relling MV, Krynetski EY, Evans WE. Polymorphism of the thiopurine S-methyltransferase gene in African-Americans. *Hum mol genet* 1999; 8: 371-376.

Honchel R, Aksoy IA, Szumlanski C, Wood TC, Otterness DM, Wieben ED, Weinshilboum RM. Human Thiopurine Methyltransferase: molecular cloning and expression of T84 colon carcinoma cell c DNA. *Mol Pharmacol* 1993; 43: 878-887.

Innocenti F, Danesi R, Favre C, Nardi M, Menconi MC, di Paolo Ad et al. Variable correlation between 6-mercaptopurine metabolites in erythrocytes and hematologic toxicity:

implications for drug monitoring in children with acute lymphoblastic leukemia. *Ther Drug Monit* 2000; 22: 375-382.

Kaplan EL, Meier P. Nonparametric estimation from incomplete observation. *J Am Statist Ass* 1958; 53: 457-481.

Koren G, Langevin AM, Olivieri N, Giesbrecht E, Zipursky A, Greenberg M. Diurnal variation in the pharmacokinetics and mielotoxicity of mercaptopurine in children with acute lymphocytic leukemia. *AJDC* 1990; 144: 1135-1137.

Krynetski EY, Schuetz JD, Galpin AJ, Pui CH, Relling MV, Evans WE. A single point leading to loss of catalytic activity in human thiopurine S-methyltransferase. *Proc. Natl. Acad. Science* 1995; 92: 949-953.

Krynetski EY, Fessing MY, Yates CR, Sun D, Schuetz JD, Evans WE. Promoter and intronic sequences of the human thiopurine S-methyltransferase (TPMT) gene isolated from a human Pac 1 Genomic Library. *Pharm Res* 1997; 14: 1672-1678.

Krynetski EY, Evans WE. Pharmacogenetics as a molecular basis for individualized drug therapy: The thiopurine S-methyltransferase paradigm. *Pharm Res* 1999; 16: 342-349.

Lennard L. Assay of 6-Thioinosinic acid and 6-thioguanine nucleotides, active metabolites of 6-mercaptopurine, in human red blood cells. *J Chromatogr* 1987; 423: 169-78.

Lennard L, Lilleyman JS, Loon JV, Weinshilboum RM. Genetic variation in response to 6-mercaptopurine for childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* 1990; 336: 225-9.

Lennard L, Singleton HJ. High-performance liquid chromatographic assay of the methyl and nucleotide metabolites of 6-mercaptopurine: quantitation of red blood cell 6-thioguanine nucleotide, 6-thioinosinic acid and 6-methylmercaptopurine metabolites in a single sample. *J Chromatogr* 1992; 583: 83-90.

Lennard L. The clinical pharmacology of 6-mercaptopurine. *Eur J Clin Pharmacol* 1992; 43: 329-39.

Lennard L, Gibson BES, Nicole T, Lilleyman JS. Congenital thiopurine methyltransferase deficiency and 6-mercaptopurine toxicity during treatment for acute lymphoblastic leukaemia. *Arch Dis Child* 1993; 69: 577-9

Lilleyman JS, Lennard L. Mercaptopurine metabolism and risk of relapse in childhood lymphoblastic leukaemia. *Lancet* 1994; 343: 1188-1190.

Lindqvist M, Haglund S, Almer S, Peterson C, Taipalensu J, Hertervig E et al. Identification of two novel sequence variants affecting thiopurine methyltransferase enzyme activity. *Pharmacogenetics* 2004; 14: 261-265.

Lu HF, Shih MC, Hsueh SC, Chen CM, Chang JY, Chang JG. Molecular analysis of the thiopurine S-methyltransferase alleles in Bolivians and Tibetans. *Pharmacogenetics. Clin Pharm Ther* 2005; 30: 491-496.

Marinaki Am, Arenas M, Khan ZH, Lewis CM, Shobowale-Bakre EM et al. Genetic determinants of the thiopurine methyltransferase intermediate activity phenotype in British Asians and Caucasians. *Pharmacogenetics* 2003; 13: 97-105.

Marle MEVDA, Gurwitz D, Detmar SB, Enzing CM, Hopkins MM, Mesa EG, Ibarreta D. Cost-effectiveness of pharmacogenomics in clinical practice: a case study of thiopurine

methyltransferase genotyping in acute lymphoblastic leukemia in Europe. *Pharmacogenomics* 2006; 7: 783-792.

Matheson EC, Hall AG. Expression of DNA mismatch repair proteins in acute lymphoblastic leukaemia and normal bone marrow. *Adv Exp Med Biol* 1999; 64: 579-583.

McLeod HL, Lin JS, Scott EP, Pui CH, Evans WE. Thiopurine methyltransferase activity in American white subjects and black subjects. *Clin Pharmacol Ther* 1994; 55:15-20.

McLeod HL. Commentary on interactions between 6-mercaptopurine therapy and thiopurine-methyl-transferase (TPMT) activity. *Eur J Clin Pharmacol* 1995; 48: 85-6.

McLeod HL, Pritchard SC, Githang J, Indalo A, Ameyaw MM, Powrie RH, Booth L, Colie-Duguid ESR. Ethnic differences in thiopurine methyltransferase pharmacogenetics: evidence for allele specificity in Caucasian and Kenyan individuals. *Pharmacogenetics* 1999; 9: 773-776.

McLeod HL, Krynetski Ey, Relling MV, Evans WE. Genetic polymorphism of thiopurine methyltransferase and its clinical relevance for childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2000; 14: 567-72.

Nelson DL, Cox MM. Biossíntese de aminoácidos, nucleotídeos e moléculas relacionadas. In: *Lehninger Princípios de Bioquímica*. 3ed. São Paulo: Sarvier, 2002. p. 666-679.

Newton Cr, Graham A, Heptinstallm LE, Parrel SJ, Summers C, Kalsheker N, Smith JC, Markham Af. Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Res* 1989; 17: 2503-2516.

Nygaard U, Toft N, Schmiegelow. Methylated metabolites of 6-mercaptopurine are associated with hepatotoxicity. *Clin Pharmacol Ther* 2004; 74: 274-281.

Okada Y, Nakamura K, Kodama T, Ueki K, Tsukada Y, Maezawa A, Tsukamoto N, Nojima Y, Ishizaki T, Horiuchi R, Yamamoto K. Thiopurine Methyltransferase genotype and phenotype status in Japanese Patients with Systemic Lupus Erythematosus. *Biol Pharm Bull* 2005; 11: 2117-2119.

Oliveira BM, Murao M, Oliveira HM, Ramos G, Viana MB. Intensity of chemotherapy partially explains the prognostic influence of malnutrition in children with lymphoblastic leukemia. *Int J Hematol* 1996; 64 (Suppl 1):S87.

Oliveira BM. Avaliação da adesão ao tratamento em crianças com leucemia linfoblástica através de métodos clínicos e laboratoriais: associação com fatores sócio-econômicos [tese]. Belo Horizonte (MG): Universidade Federal de Minas Gerais; 2002.

Oliveira BM, Diniz MS, Viana MB. Leucemias agudas na infância. *Rev Méd Minas Gerais* 2004 (a); 14 (1 Supl 1): 33-39.

Oliveira BM, Viana MB, Zani CL, Romanha AJ. Clinical and laboratory evaluation of compliance in Acute Lymphoblastic Leukaemia. *Arch Dis Ch* 2004 (b); 89: 785-88.

Oliveira BM, Romanha AJ, Alves TMA, Viana MB, Zani CL. An improved HPLC method for quantification of 6-mercaptopurine and its metabolites in red blood cells. *Braz J Med Biol Res*, 2004 (c); 37: 649-58.

Otterness D, Szumlanski C, Lennard L, Klemetsdal B, Aarbakke J, Park-Hah JO et al. Human thiopurine methyltransferase pharmacogenetics: gene sequence polymorphisms. *Clin Pharmacol Ther* 1997; 62: 60-73.

Otterness D, Szumlanski C, Wood TC, Weinshilboum RM. Human thiopurine methyltransferase pharmacogenetics. Kindred with a terminal exon splice junction mutation that results in loss of activity. *J Clin. Invest.* 1998; 101:1036-1044.

Paes CA. Estudo imunofenotípico da leukemia linfoblástica na criança. Associação com a situação sócio-econômica e outros fatores biológicos ao diagnóstico [dissertação]. Belo Horizonte (MG): Universidade Federal de Minas Gerais; 2000.

Parra FC, Amado RC, Lambertucci JR, Rocha J, Antunes CM, Pena SDJ. Color and genomic ancestry in Brazilians. *Am J Hum Genet* 2003; 100: 177-182.

Pearson ADJ, Amineddine HÁ, Yule M, Mills S, Long DR, Craft AW et al. The influence of serum methotrexate concentration and drug dosage on outcome in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Br Journal Cancer* 1991; 64: 169-173.

Pimenta JR, Zuccherate LW, Debes AA, Moselli L, Soares RP, Moura-Neto RS, Rocha J, Bydlowski SP, Pena SDJ. Color and genomic ancestry in Brazilians: a study with forensic microsatellites. *Hum Hered* 2006; 62: 190-195.

Poplack DG, Balis FM, Zimm S. The pharmacology of orally administered chemotherapy. *Cancer* 1986; 58: 473-480.

Pui CH, Evans WE. Acute lymphoblastic leukemia. *N Eng J Med* 1998; 339: 605-615

Pui CH, Campana D, Evans WE. Childhood acute lymphoblastic leukemia – current status and future perspectives. *Lancet Oncol* 2001; 2: 597-607.

Pui CH, Schrappe M, Ribeiro RC, Niemeyer CM. Childhood and Adolescent Lymphoid and Myeloid Leukemia. *Hematology* 2004; 118-145.

Pui CH, Evans WE. Treatment of acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med.* 2006; 354: 166-178.

Relling MV, Hancock ML, Rivera GK, Sandlund JT, Ribeiro RC, Krynetski EY. Mercaptopurine therapy intolerance and heterozygosity at the thiopurine S-methyltransferase gene locus. *J Natl Cancer Inst* 1999 (a); 91: 2001-8.

Relling MV, Hancock ML, Boyett JM, Pui C-H, Evans WE. Prognostic importance of 6-mercaptopurine dose intensity in acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1999 (b); 93: 2817-2823.

Relling MV, Rubnitz JE, Rivera GK, Boyett JM, Hancock ML, Feliz CA, Kum LE, Walter AW, Evans WE, Pui C-H. High incidence of secondary brain tumours after radiotherapy and antimetabolites. *Lancet* 1999 (c); 354: 34-39.

Relling MV, Pui C-H, Cheng C, Evans WE. Thiopurine methyltransferase in acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2006; 107: 843-844.

Reis M, Santoro A, Suarez-Kurtz G. Thiopurine methyltransferase phenotypes and genotypes in Brazilians. *Pharmacogenetics* 2003; 13: 371-373.

Roberts, L.R., Barclay. M. L., Geary, R. B., Kennedy, M. A. A multiplexed allele-specific polymerase chain reaction assay for the detection of common thiopurine S-methyltransferase (TPMT) mutations. *Clin Chim Acta* 2004; (341): 49-53.

Rocha JC., Cheng C, Liu Wei, Kishi Shinji, Soma Das, Cook EH et al. Pharmacogenetics of outcome in children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2005; 105: 4752 - 4758

Salavaggione OE, Wang L, Wiepert M, Yee VC, Weinshlboum RM. Thiopurine S-methyltransferase pharmacogenetics: variant allele function and comparative genomics. *Pharmacogenet genomics* 2005; 15: 801-815.

Sambrook, J., E.F. Maniatis, T. Molecular cloning: a laboratory manual. CHS Press, New York, NY- USA. 1989

Sanguinetti, C.J., Dias Neto, E., Simpson, J.G.A. Rapid silver stainig and recovery of PCR products separeted on polyacrylamide gels. *BioTechniques*, 1994; 42: 915-918.

Sasaki T, Goto E, Konno Y, Hiratsuka M, Mizugaki M. Three novel single nucleotide polymorphism of the human thiopurine S-methyltransferase gene in Japanese individuals. *Drug Metab Pharmacokinet* 2006; 4: 332-336.

Schaeffeler E, Lang T, Zanger UM, Eichelbaum M, Schwab M. High-throughput genotyping of thiopurine S-methyltransferase by denaturing HPLC. *Clin Chem* 2001; 47: 548-555.

Schaeffeler E, Stanulla M, Greil J, Schrappe M, Eichelbaum M, Zange VM, Schwab M. A novel TPMT missense mutation association with TPMT deficiency in a 5 year-old boy with ALL. *Leukemia* 2003; 17: 1422-1424.

Schaeffeler E, Fischer C, Brockmeier D, Weenet D, Moerike K, Eichelbaum M, Zanger U, Schwab M. Comprehensive analysis of thiopurine S-methyltransferase phenotype-genotype correlation in a large population of German-Caucasians and identification of novel *TPMT* variants. *Pharmacogenetics* 2004; 14: 407- 417.

Schaeffeler E, Eichelbaum M, Reinisch W, Zanger U, Schwab M. Three novel thiopurine S-methyltransferase allelic variants (*TPMT**20, *21, *22). Association with decreased enzyme function. *Hum mut* 2006; 921: 1-8.

Schmiegelow K, Pulczynska MK. Maintenance chemotherapy for childhood acute lymphoblastic leukemia; should dosage be guided by White blood cell counts? *Am J Pediatr Hematol Oncol* 1990 (a); 12: 462-467.

Schmiegelow K. Pulczynska MK. Prognostic significance of hepatotoxicity during maintenance chemotherapy for childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Cancer* 1990 (b); 61: 7670-772.

Schmiegelow K. Prognostic significance of methotrexate and 6-mercaptopurine dosage during maintenance chemotherapy for childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Hematol Oncol* 1991; 8: 301-312.

Schmiegelow K Schroder H, Gustafsson G, Kristinsson J, Glomstein A, Salmi T et al. Risk of relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia is related to RBC methotrexate and mercaptopurine metabolites during maintenance therapy. *J Clin Oncol* 1995; 13: 345-351.

Schmiegelow K, Glomstein A, Kristinsson J, Salmi T, Schroder H, Bjork O. Impact of morning versus evening schedule for oral methotrexate 6-mercaptopurine on relapse risk for children with acute lymphoblastic leukemia. *J Pediatr Hematol Oncol* 1997; 19: 102-109.

Schmiegelow K, Bjork O, Glomstein A, Gustafsson G, Keiding N et al. Intensification of Mercaptopurine/Methotrexate maintenance chemotherapy may increase the risk of relapse for some children with Acute Lymphoblastic Leukemia. *J Clin Oncol* 2003; 21: 1332-1339.

Seki T, Tanaka T, Nakamura Y. Genomic structure and multiple single-nucleotide polymorphisms (SNPs) on the thiopurine –methyltransferase (*TPMT*) gene. *J Hum Genet* 2000; 45: 299-302.

Stanulla M, Schaeffeler E, Flohr T, Cario G, Schrauder A, Zimmermann M, Welte K et al. Thiopurine Methyltransferase (TPMT) genotype and early treatment response to

mercaptopurina in childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *JAMA* 2005; 293: 1485-1489.

Szumilanski C, Otterness D, Her C, Lee D, Brandriff B, Kessell D et al. Thiopurine methyltransferase pharmacogenetics: human gene cloning and characterization of a common polymorphism. *DNA Cell Biol* 1996; 15: 17-30.

Swann PF, Waters TR, Moulton DC, Xu Y-Z, Zheng Q, Edwards M, Mace R. Role of postreplicative DNA mismatch repair in the cytotoxic action of thioguanine. *Science* 1996; 273 (5278): 1109-1112.

Tai H-L, Krynetski EY, Schuetz EG, Yanishevski Y, Evans WE. Enhanced proteolysis of thiopurine S- methyltransferase (TPMT) encoded by mutants alleles in humans (TPMT*3A, TPMT*2): mechanisms for the genetic polymorphism of TPMT activity. *Pro Natl Acad Sci* 1997; 94: 6444-6449.

Uderzo C, Conter V, Dini G, Locatelli F, Miniero R, Tamaro P. Treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia after the first relapse: curative strategies. *Haematologica* 2001; 86:1-7.

Viana MB, Fernandes RAF, Oliveira BM, Murao M. Paes CA, Duarte AA. Nutritional and socio-economic status in the prognosis of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 2001; 86: 113-120.

Wang L, Sullivan W, Toft D, Weinshilboum R. Thiopurine S-methyltransferase pharmacogenetics: chaperone protein association and allozyme degradation. *Pharmacogenetics* 2003; 13: 555-564.

Wang L., Weinshilboum R. Thiopurine S-methyltransferase pharmacogenetics: insights, challenges and future directions. *Oncogene* 2006; 25: 1629-1638.

Weinshilboum R, Wang L. Pharmacogenetics: inherited variation in amino acid sequence and altered protein quantity. *Clin Pharmacol Ther* 2004; 75: 253-258.

Weinshilboum RM, Sladek SL. Mercaptopurine pharmacogenetics: monogenic inheritance of erythrocyte thiopurine methyltransferase activity. *Am J Hum Genet* 1980; 32: 651-662.

Woelderink A, Ibarreta D, Hopkins MM, Rodriguez-Cerezo E. The current clinical practice of pharmacogenetic testing in Europe: TPMT and HER2 as case studies. *The Pharmacogenomics J* 2006; 6: 3-7.

Wu H, Horton JR, Battaile K, Allali-Hassani A, Martin F, Zeng H, Loppnau P et al. Structural basis of allele variation of human thiopurine-S-methyltransferase. *Proteins* 2007; 67: 198-208.

Yan L, Zhang S, Eiff B et al. Thiopurine methyltransferase tandem repeat: genotype-phenotype correlation analysis. *Clin Pharmacol Ther* 2000; 68: 210-219.

Yates CR, Krynetski EY, Loennechen T, Fessing MY, Tai HL, Pui CH et al. Molecular diagnosis of thiopurine S-methyltransferase deficiency: genetic basis for azathioprine and mercaptopurine intolerance. *Ann Intern Med* 1997; 126: 608-614.

Zhang JP, Zhou SF, Chen X, Huang M. Determination of intra-ethnic differences in the polymorphisms of thiopurine S-methyltransferase in Chinese. *Clin Chim Acta* 2006; 365: 337-341.

Zimm, S., Collins, J. M., O'Neill, D., Chabner, B. A., Poplack, D. G. Inhibition of first pass metabolism in cancer chemotherapy: interaction of 6-mercaptopurine and allopurinol. *Clinic Pharmac and Ther*, 1983; 34: 810-816.

8- ANEXOS

8.1- ANEXO 1: APROVAÇÃO DA CÂMARA DO DEPARTAMENTO DE PEDIATRIA E NO SERVIÇO DE HEMATOLOGIA DO HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA UFMG

Parecer da Câmara do Departamento de Pediatria nº 84/2003

Projeto: Polimorfismo do gene da tiopurinamiltransferase em uma população de crianças e adolescentes com leucemia linfocítica aguda.

Interessados: Professores. Benigna Maria de Oliveira e Marcos Borato Viana.


Objetivo: estudar o polimorfismo do gene da tiopurinamiltransferase (TPMT) em uma população de crianças e adolescentes com leucemia linfocítica aguda (LLA).

Comentários: o estudo será realizado em uma população de crianças e adolescentes com LLA admitidas no Hospital das Clínicas da UFMG e submetidas aos protocolos de tratamento do Grupo Cooperativo Brasileiro para Tratamento de Leucemia Infantil. Os autores se propõem a determinar a frequência dos principais alelos do gene da TPMT, a correlacionar o genótipo com dados clínicos e laboratoriais obtidos durante a fase de manutenção da quimioterapia, a correlacionar o genótipo com a dosagem dos metabólitos da 6-mecarptopurina (6-MP) e a comparar a sobrevida dos pacientes de acordo com o genótipo. Serão incluídos no protocolo todos pacientes portadores de LLA, sem tratamento prévio, com idade inferior a 18 anos, prevendo-se o estudo de aproximadamente 100 pacientes.

O uso diário da 6-MP por via oral é o principal componente da maioria dos esquemas de quimioterapia na chamada fase de manutenção do tratamento da LLA. Este estudo se justifica pelo fato de que o polimorfismo do gene da tiopurinamiltransferase ser responsável pela grande diferença na atividade da enzima TPMT, afetando o metabolismo da 6-MP. O estudo do polimorfismo do gene da tiopurinamiltransferase poderá trazer avanços para uma maior compreensão do tratamento de manutenção da LLA, aspecto em que os resultados nos países como o Brasil são inferiores àqueles dos países desenvolvidos. O presente estudo está inserido na linha de pesquisa do Grupo de Hematologia Pediátrica do Departamento de Pediatria da UFMG, sobre fatores prognósticos nas leucemias infantis.


Do ponto de vista ético o projeto é bem cuidado e os procedimentos a serem realizados serão aqueles já exigidos pelo próprio tratamento. O termo de consentimento livre e esclarecido está bem elaborado. O projeto após submetido à Câmara do PED será encaminhado à Comissão de Ética UFMG.

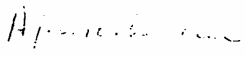
Conclusão: Como o projeto tem interesse clínico e social, não fere normas éticas, traz possíveis contribuições ao tratamento da LLA na infância e adolescência, somos pela sua aprovação.

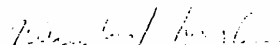

Prof. Roberto Assis Ferreira
relator

Aprovado em Reunião da Câmara Departamental

EM: 17/12/2003


Prof. Benigna Maria de Oliveira


Prof. Melma Cristina Dias Clementino
Coord. Serv. de Hematologia Oncologia
fone: (51) 3633-1111


Prof. Marcos Borato Viana

**8.2- ANEXO 2: APROVAÇÃO DA DIRETORIA DE ENSINO, PESQUISA E
EXTENSÃO DO HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA UFMG**



Universidade Federal de Minas Gerais
Hospital das Clínicas
Diretoria de Ensino, Pesquisa e Extensão - DEPE

UFMG

Belo Horizonte, 25 de junho de 2004.

PROCESSO Nº 008/04.

TÍTULO: "Polimorfismo do gene da Tiopurinametiltransferase (TPMT) em uma população de crianças com Leucemia Linfocítica Aguda".

Sr(a) Pesquisador(a):

Reportando-nos ao projeto de pesquisa acima referenciado, considerando sua concordância com o parecer da Comissão de Avaliação Econômico Financeira de Projetos de Pesquisa sobre o mesmo e sua aprovação pelo COEP/UFMG em 14/04/2004, esta Diretoria aprova seu desenvolvimento no âmbito institucional.

Solicitamos enviar à DEPE relatório parcial ou final, após um ano.

Atenciosamente,

PI Prof. Urquiza Helena Meira Paulino
Diretora da DEPE/HC-UFMG

À

Prof. Dra. Benigna Maria de Oliveira
Depto. Pediatria
Faculdade Medicina/UFMG

**8.3- ANEXO 3: APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UFMG
(COEP - UFMG)**

UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG - COEP

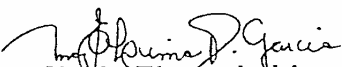
Parecer nº. ETIC 047/04

Interessados: Profa. Dra. Benigna Maria de Oliveira
Prof. Dr. Marcos Borato Viana
Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

DECISÃO:

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP, aprovou dia 14 de abril de 2004 o projeto de pesquisa intitulado « **Polimorfismo do Gene da Tiopurinametiltransferase (TPMT) em uma População de Crianças com Leucemia Linfocítica Aguda.** » e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do referido projeto.

O Relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do Projeto.


Prof.^a Dra. Maria Elena de Lima Perez Garcia
Presidente do COEP

8.4- ANEXO 4: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Termo de consentimento livre e esclarecido.

Eu/nós _____

responsável(eis) por _____

portador de leucemia linfocítica aguda (LLA) fui devidamente informado pelo médico pesquisador que a 6-Mercaptopurina (Purinethol^R) é um dos principais medicamentos utilizados no tratamento da LLA. A ação desta medicação é determinada, em grande parte, por uma substância presente no organismo chamada enzima Tiopurina Metiltransferase. Algumas pessoas possuem uma alteração genética que causa uma diminuição da atividade desta substância. Estas pessoas necessitam de doses menores das 6-Mercaptopurina quando comparadas com as pessoas com atividade normal da enzima. Aqueles que apresentam a deficiência da enzima apresentam maior risco de infecções, de interrupção da quimioterapia por diminuição na contagem de leucócitos e plaquetas, o que pode influenciar no resultado obtido com o tratamento. Fui informado, ainda, que a identificação das pessoas que possuem esta alteração genética poderá ser útil para que as doses da 6-Mercaptopurina sejam adequadas para estes pacientes, e que o conhecimento destes aspectos é importante para que se possa melhorar o tratamento e as chances de cura da LLA.

Fui esclarecido sobre a proposta deste projeto de pesquisa **“Polimorfismo do gene da Tiopurina Metiltransferase (TPMT) em uma população de crianças com Leucemia Linfocítica Aguda (LLA)”**, que

pretende fazer o estudo genético da enzima Tiopurina Metiltransferase nos pacientes com LLA. Para participar do estudo estarei autorizando que os pesquisadores utilizem o sangue coletado de meu filho/a para a realização de hemograma para o estudo genético desta enzima. Fui esclarecido de que não será coletado sangue apenas para realização de pesquisa, que não será coletada maior quantidade de sangue do que a necessária para o exame de rotina, e que o sangue não será utilizado para outros estudos.

Eu autorizo o médico pesquisador a incluir meu filho/a neste estudo. Também dou meu consentimento para o fornecimento dos dados clínicos e laboratoriais do meu filho/a para a as pessoas responsáveis pela coordenação geral da pesquisa para avaliação dos resultados deste estudo. Todas as avaliações serão feitas respeitando-se o segredo profissional e a proteção dos dados pessoais.

Reconheço que fui devidamente informado de que não ocorrerão mudanças no tratamento ou acompanhamento já instituído e que essa permissão pode ser retirada a qualquer momento que desejarmos sem que haja nenhuma penalidade.

LOCAL:.....DATA.....

Assinatura dos Responsáveis:

.....

Médico assistente.....

Médico pesquisador.....

Pesquisadores responsáveis: Prof. Marcos Borato Viana, Profa. Benigna Maria de Oliveira e Dra. Mitiko Murao.

Telefones para contatos: 32489397 / 32489551

Telefone do Comitê de Ética em Pesquisa – UFMG: 32489380

8.5- ANEXO 5: ESQUEMA TERAPÉUTICO (GBTLLA - 93)

ESQUEMA TERAPÊUTICO (GBTLI-93)

Terapia de indução para os grupos de Risco Básico Verdadeiro e Risco Básico

Drogas	Dose e via de administração	Dias de administração
Fase 1		
Dexametasona (DXM)	6mg/m ² /dia –via oral	1 a 28
Vincristina (VCR)	1,5mg/m ² /dose - endovenoso	1, 8, 15 e 22
Daunorrubicina (DNB)	25 mg/m ² /dose - endovenoso	1, 8, 15 e 22
MADIT*	intratecal	1 e 29
Fase 2		
L-asparaginase (L-ASP)	10.000 unidades/m ² /dose – endovenoso (se plaquetas < 50.000/mm ³) ou intramuscular (se plaquetas > 50.000/mm ³)	29,31,33,35,37,39,41,43
Arabinosil citosina (ARA-C)	75/mg/m ² /dose - subcutâneo	29 a 32 e 36 a 39
MADIT	intratecal	43

* **MADIT**: methotrexate, 6 mg para crianças <1 ano, 8 mg para 1 a 2 anos, 10 mg para 2 a 3 anos, e 12 mg para ≥3 anos; arabinosil citosina: 20 mg para crianças <1 ano, 30 mg para 1 a 2 anos, 50 mg para 2 a 3 anos, e 70 mg para ≥3 anos; dexametasona: 2 mg/m², dose máxima de 2 mg

Terapia de indução para o grupo de Alto Risco

Drogas	Dose e via de administração	Dias de administração
Fase 1		
Dexametasona (DXM)	6mg/m ² /dia –via oral	1 a 28
Vincristina (VCR)	1,5mg/m ² /dose - endovenoso	1, 8, 15 e 22
Daunorrubicina (DNB)	25 mg/m ² /dose - endovenoso	1, 8, 15 e 22
L-asparaginase (L-ASP)	10.000 unidades/m ² /dose– endovenoso (se plaquetas < 50.000/mm ³) ou intramuscular (se plaquetas > 50.000/mm ³)	15 a 22
MADIT	intratecal	1 e 29
Fase 2		
Arabinosil citosina (ARA-C)	750/mg/m ² /dose – endovenoso – de 12 em 12 horas	36,37 e 38
L-asparaginase (L-ASP)	6.000 unidades/m ² /dose - intramuscular	6 horas após o término da infusão do ARA-C
MADIT	intratecal	43

Terapia de intensificação para os grupos Risco Básico Verdadeiro, Risco Básico e Alto Risco

Drogas	Dose e via de administração	Dias de administração
6-mercaptopurina (6-MP)	50/mg/m ² /dia – via oral	50 a 95
Methotrexate	2g/m ² /dose – endovenoso (infusão contínua em 24 horas)	50, 65, 80, 95
Leucovorin	15mg/m ² /dose, intramuscular, endovenoso ou via oral, de 6 em 6 horas, total de 4 doses	Iniciar na hora 36 a partir do início da infusão do MTX
MADIT	Intratecal	50, 65, 80, 95

Terapia de re-indução para os grupos Risco Básico Verdadeiro e Risco Básico

Drogas	Dose e via de administração	Dias de administração
Fase 1		
Dexametasona (DXM)	6mg/m ² /dia –via oral	106 a 127
Vincristina (VCR)	1,5mg/m ² /dose - endovenoso	106, 113, 120 e 127
L-asparaginase (L-ASP)	10.000 unidades/m ² /dose - intramuscular	106,109, 113 e 116
MADIT	Intratecal	106 e127
Fase 2		
6-mercaptopurina (6-MP)	50/mg/m ² /dia – via oral	134 a 148
Arabinosil citosina (ARA-C)	75/mg/m ² /dose - subcutâneo	134 a 137 e 141 a 144
MADIT	Intratecal	148

Terapia de re-indução para o grupo Alto Risco

Drogas	Dose e via de administração	Dias de administração
Fase 1		
Dexametasona (DXM)	6mg/m ² /dia –via oral	106 a 127
Vincristina (VCR)	1,5mg/m ² /dose - endovenoso	106, 113, 120 e 127
L-asparaginase (L-ASP)	10.000 unidades/m ² /dose - intramuscular	106,109, 113 e 116
MADIT	intratecal	106 e127
Fase 2		
6-mercaptopurina (6-MP)	50/mg/m ² /dia – via oral	134 a 148
Arabinosil citosina (ARA-C)	75/mg/m ² /dose - subcutâneo	134 a 137 e 145 a 148
MADIT	intratecal	134, 141 e 148
Radioterapia em SNC*		134 a 148 (10 a 12 frações)

* **Dose de radioterapia para pacientes sem infiltração em SNC:** 10 Gy para crianças ≥1 ano e < 2anos, 12 Gy para ≥ 2 anos e < 3 anos, 18 GY para > 3anos; **para pacientes com infiltração em SNC:** 12 Gy para crianças ≥1 ano e < 2anos, 18 Gy para ≥ 2 anos e < 3 anos, 24 Gy para > 3anos.

Primeira fase da terapia de manutenção para o grupo Alto Risco

Drogas	Dose, via de administração e dias de administração em cada ciclo	Semanas do tratamento
23, 32, 41, 50, 59 e 68		
Bloco A		
Arabinosil citosina (ARA-C)	750/mg/m ² /dose – endovenoso – de 12 em 12 horas – total de 6 doses	
L-asparaginase (L-ASP)	6.000 unidades/m ² /dose – intramuscular - 6 horas após o término da infusão do ARA-C	
26, 35, 44, 53, 62 e 71		
Bloco B		
6-mercaptopurina (6-MP)	75 mg/m ² / dia – via oral – dias 1 a 21	
Metotrexato (MTX)	40 mg/m2/semana –intramuscular – dias 1, 8 e 15	
29, 38, 47, 56, 65 e 74		
Bloco C		
Prednisona	40 mg/m ² /dia – via oral – dias 1 a 14	
Vincristina	1 mg/m ² /dose (máximo de 2mg) – dias 1, 8 e 15	

- A terapia de manutenção do GBTLI LLA- 93 está descrita no item 3.3.1.

8.6- ANEXO 6: ESQUEMA TERAPÊUTICO PARA O GBTLI LLA - 99

ESQUEMA TERAPÊUTICO (GBTLLA - 99)**GRUPO DE BAIXO RISCO DE RECIDIVA****Terapia de indução para o grupo de Baixo Risco**

Drogas	Dose e via de administração	Dias de administração
Prednisona (PDN)	40mg/m ² /dia –via oral	1 a 28
Vincristina (VCR)	1,5mg/m ² /dose - endovenoso	1, 8, 15 e 22
Daunoblastina (DNB)	25 mg/m ² /dose - endovenoso	1, 8, 15 e 22
L-asparaginase (L-ASP)	5000 UI/m ² /dose – intramuscular	9 doses
Ciclofosfamida	1g/m ² – via endovenosa com MESNA 300mg/m ² /dose na hora 0 e 4	28
Citarabina (ARA-C)	75/mg/m ² /dose SC	28 a 31, 35 a 38 (total: 8 doses)
6-MP	50mg/m ² /dia – via oral	28 ao 42
MADIT (Metotrexato /ARA-C/ Dexametasona)	intratecal	0, 14, 28

* **MADIT**: metotrexato (MTX), 8 mg para crianças <1 ano, 10 mg para 2 anos, 12 mg para 3 a 8 anos, e 15 mg para ≥ 9 anos; ARA-C: 16 mg para crianças <1 ano, 20 mg para 2 anos, 24 mg para 3 a 8 anos, e 30 mg para ≥ 9 anos; dexametasona (DXM): 2 mg/m², dose máxima de 2 mg

Terapia de intensificação para o grupo de Baixo Risco

Drogas	Dose e via de administração	Semana do tratamento
MTX	2g/m ² /EV (infusão em 6 horas), a cada 2 semanas, com leucovorin 15mg/m ² /dose, de 6 em 6 horas, a partir da hora 36 – via endovenosa	7, 9, 11, 13
6-MP	50mg/m ² /dia – via oral	7 a 13
MADIT	intratecal	8, 10, 12, 14

Terapia da consolidação tardia para o grupo de Baixo Risco

Drogas	Dose e via de administração	Semana do tratamento
Dexametasona (DXM)	6mg/m ² /dia –via oral	14, 16, 18 (7 dias / semana)
Vincristina (VCR)	1,5mg/m ² /dose - endovenoso	14 a 18 (1 dose/semana total: 5 doses)
Doxorrubicina	30 mg/m ² /dose - endovenoso	15 e 17 (1 dose/semana total: 2 doses)
L-asparaginase (L-ASP)	5000 UI/m ² /dose – intramuscular	15 e 16 (2 doses/semana total: 4 doses)
Ciclofosfamida	1g/m ² –via endovenosa com MESNA 300mg/m ² /dose na hora 0 e 4	19 (dose única)
Citarabina (ARA-C)	75/mg/m ² /dose SC	19, 20, 21 (4 doses/semana total: 12 doses)
6-Mercaptopurina	50mg/m ² /dia – via oral	19 a 21 (21 dias)
MADIT	intratecal	14, 18, 22

- A terapia de manutenção para os Grupos 1 e 2 do Baixo Risco de recidiva está descrita no item 3.3.2.1 dos pacientes e métodos.

ESQUEMA TERAPÊUTICO (GBTLLA - 99)**GRUPO DE ALTO RISCO DE RECIDIVA****Terapia de indução para o grupo de Alto Risco**

Drogas	Dose e via de administração	Dia da administração
Prednisona (PDN)	40mg/m ² /dia –via oral	1 a 28
Vincristina (VCR)	1,5mg/m ² /dose - endovenoso	1, 8, 15 e 22
Daunoblastina (DNB)	25 mg/m ² /dose - endovenoso	1, 8, 15 e 22
L-asparaginase (L-ASP)	5000 UI/m ² /dose – intramuscular	9 doses
Ciclofosfamida	1g/m ² – via endovenosa com MESNA 300mg/m ² /dose na hora 0 e 4	28
Citarabina (ARA-C)	75/mg/m ² /dose SC	28 a 31, 35 a 38 (total: 8 doses)
6-MP	50mg/m ² /dia – via oral	28 ao 42
MADIT (Metotrexato / ARA-C/ Dexametasona)	intratecal	0, 14, 28

* **MADIT**: metotrexato (MTX), 8 mg para crianças <1 ano, 10 mg para 2 anos, 12 mg para 3 a 8 anos, e 15 mg para ≥9 anos; ARA-C: 16 mg para crianças <1 ano, 20 mg para 2 anos, 24 mg para 3 a 8 anos, e 30 mg para ≥9 anos; dexametasona (DXM): 2 mg/m², dose máxima de 2 mg

Terapia de intensificação para o grupo de Alto Risco - BLOCO A

Drogas	Dose e via de administração	Dia da administração (semana 8)
MTX	2g/m ² , via endovenosa (infusão em 6 horas)	1
Leucovorin	15mg/m ² /dose, via endovenosa, 6/6h (4 doses), a partir da hora 36 do início do MTX	
6-mercaptopurina	75 mg/m ² /dia – via oral	2 a 5
Citarabina (ARA-C)	2g/m ² , dose única, via endovenosa	5
Ciclofosfamida	200mg/m ² /dose, 12/12h (total: 5 doses), via endovenosa	6 a 8
MADIT (MTX/ARA-C/DEXA)	intratecal	8

Terapia de intensificação para o grupo de Alto Risco - BLOCO B

Drogas	Dose e via de administração	Dia da administração (semana 10)
MTX	2g/m ² , via endovenosa (infusão em 6 horas)	1
Leucovorin	15mg/m ² /dose, via endovenosa, 6/6h (4 doses), a partir da hora 36 do início do MTX	
6-MP	150mg/m ² /dia, via oral	2 a 5
Citarabina (ARA-C)	2g/m ² , dose única, via endovenosa	5
MTX	50mg/m ² , via endovenosa (infusão em 4 horas)	7
MADIT	intratecal	8

Terapia de intensificação para o grupo de Alto Risco

Drogas	Dose e via de administração	Semana do tratamento
Dexametasona (DXM)	6mg/m ² /dia – via oral	12,14,16 (7 dias / semana)
Vincristina (VCR)	1,5mg/m ² /dose - endovenoso	12 a 16 (1 dose /semana total: 5 doses)
Doxorrubicina	30 mg/m ² /dose - endovenoso	13 e 15 (1 dose/semana total: 2 doses)
L-asparaginase (L-ASP)	5000 UI/m ² /dose – intramuscular	13 e 14 (2 doses/semana total: 4 doses)
Ciclofosfamida	1g/m ² –via endovenosa com MESNA 300mg/m ² /dose na hora 0 e 4	17 (dose única)
Citarabina (ARA-C)	75/mg/m ² /dose SC	17, 18, 19 (4 doses/semana total: 12 doses)
6-Mercaptopurina MADIT	50mg/m ² /dia – via oral intratecal	17 a 19 (21 dias) 17, 20

Terapia de intensificação para o grupo de Alto Risco BLOCO C

Drogas	Dose e via de administração	Dia da administração (semana 21)
MTX	2g/m ² , via endovenosa (infusão em 6 horas)	1
Leucovorin	15mg/m ² /dose, via endovenosa, 6/6h (4 doses), a partir da hora 36 do início do MTX	
6-MP	150mg/m ² /dia, via oral	2 a 5
Etoposídeo	150mg/m ² /dia, via endovenosa	5,6,7 (total:3doses)
Citarabina (ARA-C)	2g/m ² , dose única, via endovenosa	8

Terapia de intensificação para o grupo de Alto Risco BLOCO D

Drogas	Dose e via de administração	Dia da administração (semana 23)
Ifosfamida	1,8 g/m ² /dia – via endovenosa, com MESNA 400mg/m ² /dose, na hora 0, 4 e 8	1 ao 4 (total: 4 doses)
Etoposídeo MADIT	150mg/ m ² /dia - via endovenosa intratecal	1 ao 4 (total: 4 doses) 8

Terapia da consolidação tardia para o grupo de Alto Risco

Drogas	Dose e via de administração	Semana do tratamento
Dexametasona (DXM)	6mg/m ² /dia –via oral	25, 27, 29 (7 dias / semana)
Vincristina (VCR)	1,5mg/m ² /dose - endovenoso	25 a 29 (1 dose/semana total: 5 doses)
Doxorrubicina	30 mg/m ² /dose - endovenoso	26 e 28 (1 dose/semana total: 2 doses)
L-asparaginase (L-ASP)	5000 UI/m ² /dose – intramuscular	26,27,28 (2 doses/semana total: 6 doses)
Ciclofosfamida	1g/m ² –via endovenosa com MESNA 300mg/m ² /dose na hora 0 e 4	36 (dose única)
Citarabina (ARA-C)	75/mg/m ² /dose SC	36, 37, 38 (4 doses/semana total: 12 doses)
6-Mercaptopurina MADIT	50mg/m ² /dia – via oral intratecal	36 a 38 (21 dias) 30, 32

- A terapia de manutenção para o Grupo de Alto Risco de recidiva está escrita no item 3.3.2.2 dos pacientes e métodos.

,

8.7- ANEXO 7: DOSES PRESCRITAS DE 6-MP E MTX E DOSAGENS DA 6-MP, 6-TGN E MMP EM 183 AMOSTRAS DE SANGUE COLETADAS DE 36 CRIANÇAS COM LLA

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Número de identificação	Dosagem	dos	metabólitos	Dose dos	medicamentos		
70	Amostra	6-TGN	6-MP	MMP	6-MP	MTX	Leucócitos
	2	193,1	0,8	12,1	73,5	36,7	4500
	10	224,7	45,7	18,3	102,9	36,7	4000
	21	155,3	8,3	14,6	89,2	35,7	2200
	37	219,8	22,1	11,8	71,4	28,5	3600
	47	187,9	28,0	8,1	71,4	28,5	3300
	97	278,4	28,5	17,3	81,0	34,7	3400
	Média	209,9	22,3	13,7			
	Mediana	206,5	25,0	13,4			
101	Amostra	6-TGN	6-MP	MMP	6-MP	MTX	Leucócitos
	1	139,6	0,0	4,6	42,3	25,4	5100
	11	243,2	0,0	3,2	53,7	29,0	1600
	18	84,3	0,6	0,7	40,3	29,0	3500
	39	110,0	0,0	3,3	40,3	28,1	4400
	51	162,5	8,6	2,6	40,3	28,1	8400
	99	126,8	14,0	3,6	36,7	26,4	4900
	124	106,8	4,2	4,8	34,7	25,0	3600
	Média	139,0	3,9	3,3			
Mediana	126,8	0,6	3,3				
83,0	Amostra	6-TGN	6-MP	MMP	6-MP	MTX	Leucócitos
	5	96,3	0,0	1,6	55,5	30,0	4300
	32	142,8	21,7	5,9	52,0	28,1	2300
	42	133,3	0,0	6,6	52,0	28,1	2800
	77	232,5	9,6	13,2	50,5	30,3	2700
	98	181,3	0,0	6,6	49,0	28,9	3900
	115	266,7	0,0	15,8	55,1	36,7	3300
	182	144,2	0,0	9,4	55,1	36,7	2800
	Média	171,0	4,5	8,5			
Mediana	144,2	0,0	6,6				
66	Amostra	6-TGN	6-MP	MMP	6-MP	MTX	Leucócitos
	4	351,8	0,0	1,1	56,4	25,4	6400
	17	403,7	12,8	1,0	52,9	25,4	4900
	24	312,2	21,2	2,9	53,8	25,8	3300
	Média	355,9	11,4	1,7			
Mediana	351,8	12,8	1,1				
80	Amostra	6-TGN	6-MP	MMP	6-MP	MTX	Leucócitos
	22	349,2	23,3	17,3	81,7	37,3	2000
	43	330,4	0,0	10,5	58,4	28,0	4100
	53	306,9	18,0	11,1	61,1	53,0	4400
	87	299,7	0,0	23,9	64,6	32,3	2600
	131	180,4	0,0	14,5	64,0	29,9	3000
	132	225,0	0,0	24,7	64,0	29,9	3400
	200	375,9	6,8	20,1	62,5	31,3	2300
	Média	295,4	6,9	17,5			
Mediana	306,9	0,0	17,3				
64	Amostra	6-TGN	6-MP	MMP	6-MP	MTX	Leucócitos
	33	228,0	8,1	7,7	46,2	23,6	3300
	40	335,8	7,3	5,7	46,2	23,6	4000
	54	389,8	19,5	9,7	46,2	23,6	2800
	75	244,9	13,6	8,1	40,0	10,8	3800
	101	279,3	14,2	8,0	40,0	7,6	2800
	Média	295,6	12,5	7,8			
Mediana	279,3	13,6	8,0				

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

74	Amostra	6-TGN	6-MP	MMP	6-MP	MTX	Leucócitos
	20	163,6	0,0	2,5	53,5	31,4	3200
	41	139,6	0,0	10,8	65,7	26,3	3300
	61	124,3	0,0	3,3	42,1	25,3	2500
	83	205,3	0,0	6,9	41,6	30,0	5000
	134	159,4	0,0	19,5	78,1	31,3	4200
	190	149,9	15,0	14,8	79,3	35,7	2500
	Média	157,0	2,5	0,0			
	Mediana	154,7	9,6	8,8			
22	Amostra	6-TGN	6-MP	MMP	6-MP	MTX	Leucócitos
	69	411,7	0,0	6,2	64,8	33,3	4500
	127	347,7	0,0	6,0	41,6	27,7	3700
	160	289,5	8,4	0,0	45,7	27,4	3300
	181	237,1	0,0	5,5	45,7	27,4	3800
	188	354,1	11,8	13,1	52,6	31,5	2700
	231	333,7	30,3	6,2	52,6	31,5	2100
	Média	329,0	8,4	6,2			
	Mediana	340,7	4,2	6,1			
73	Amostra	6-TGN	6-MP	MMP	6-MP	MTX	Leucócitos
	78	366,1	14,9	5,9	46,8	25,2	3100
	121	224,3	46,8	6,9	45,7	24,7	3100
	143	264,1	11,8	7,1	43,4	23,4	2400
	162	262,5	16,7	4,6	43,4	23,4	2800
	196	234,8	0,0	5,4	60,7	23,4	7100
	239	221,9	8,4	2,4	38,6	15,4	1500
	279	330,7	28,6	2,0	25,0	12,2	2000
	Média	272,0	18,2	4,9			
Mediana	262,5	14,9	5,4				
69	Amostra	6-TGN	6-MP	MMP	6-MP	MTX	Leucócitos
	79	282,0	0,1	3,6	47,4	25,3	5200
	145	373,8	0,0	5,6	50,2	30,1	6500
	179	343,1	0,0	7,0	56,8	34,0	4800
	192	376,2	0,0	14,9	57,4	34,4	1800
	234	566,8	23,4	7,2	55,5	33,3	2600
	254	368,8	43,4	4,5	54,9	32,9	1500
	277	444,4	14,7	6,1	54,9	32,9	3000
	Média	393,6	11,7	7,0			
Mediana	373,8	6,1	6,1				
47	Amostra	6-TGN	6-MP	MMP	6-MP	MTX	Leucócitos
	90	379,6	0,0	2,9	48,4	24,4	3600
	137	334,6	17,9	1,0	45,7	30,4	2600
	171	2,2	0,0	0,0	49,0	23,5	4600
	197	435,4	19,5	11,5	55,5	27,7	3500
	253	410,3	0,0	1,5	45,7	21,9	4100
	288	575,3	0,0	3,3	54,9	25,5	2600
	395	452,4	5,6	2,5	44,3	24,4	4100
	Média	370,0	6,1	3,2			
Mediana	410,3	0,0	2,5				
4	Amostra	6-TGN	6-MP	MMP	6-MP	MTX	Leucócitos
	251	322,5	5,3	1,0	28,4	14,2	3400
	284	278,4	0,0	0,5	28,4	14,2	1600
	304	276,6	0,0	0,3	27,9	13,9	2500
	338	555,3	0,0	2,8	27,6	13,8	3160
	Média	358,2	1,3	1,1			
Mediana	300,4	0,0	0,7				

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

26	Amostra	6-TGN	6-MP	MMP	6-MP	MTX	Leucócitos
	144	443,3	3,4	16,2	55,5	25,9	4500
	168	415,1	62,7	19,2	55,1	25,7	3300
	189	435,3	60,6	16,8	75,7	30,3	3700
	216	455,7	68,9	9,0	59,5	27,3	3400
	258	351,9	79,1	1,6	39,6	23,8	2900
	Média	420,3	54,9	15,3			
	Mediana	435,3	62,7	16,2			
18	Amostra	6-TGN	6-MP	MMP	6-MP	MTX	Leucócitos
	320	215,5	19,4	0,9	39,7	20,0	3340
	349	298,7	0,0	1,7	45,4	24,5	8600
	391	218,7	10,6	9,4	61,7	29,6	2900
	Média	244,3	10,0	4,0			
Mediana	218,7	10,6	1,7				
56	Amostra	6-TGN	6-MP	MMP	6-MP	MTX	Leucócitos
	246	1519,5	0,0	0,7	38,3	21,4	600
	286	1934,1	0,0	1,0	43,0	22,5	1900
	322	1337,7	0,0	0,5	49,3	24,3	2000
	Média	1597,1	0,0	0,7			
Mediana	1519,5	0,0	0,7				
24	Amostra	6-TGN	6-MP	MMP	6-MP	MTX	Leucócitos
	130	222,8	0,0	0,3	37,8	22,7	2300
	193	37,9	0,0	0,8	50,5	30,3	4700
	236	258,0	20,8	1,0	46,2	27,7	4400
	263	416,8	15,3	3,4	46,2	27,7	3500
	317	526,9	14,5	6,5	46,2	27,7	5000
	335	540,6	15,6	7,7	57,8	27,7	6500
	Média	333,8	11,0	3,3			
	Mediana	337,4	14,9	2,2			
2	Amostra	6-TGN	6-MP	MMP	6-MP	MTX	Leucócitos
	89	791,6	0,0	19,8	62,5	33,3	2300
	148	147,8	18,1	6,0	55,5	25,0	4300
	233	171,1	2,9	13,0	74,6	29,8	2500
	281	252,7	16,4	12,4	50,6	27,0	4100
	337	232,7	23,4	5,7	56,3	27,0	4300
	Média	319,2	12,1	9,0			
	Mediana	232,7	16,4	12,4			
7	Amostra	6-TGN	6-MP	MMP	6-MP	MTX	Leucócitos
	140	387,9	64,9	10,0	65,7	35,5	4800
	156	308,3	0,0	13,7	64,1	34,6	3800
	177	268,6	31,2	13,6	63,2	34,1	2600
	210	377,4	25,7	17,0	73,8	34,1	2100
	265	422,7	51,3	13,0	60,2	14,4	3500
	306	518,8	8,7	15,3	70,2	7,2	3300
	Média	380,6	30,3	13,8			
Mediana	382,6	28,4	13,7				
72	Amostra	6-TGN	6-MP	MMP	6-MP	MTX	Leucócitos
	139	637,2	7,3	14,1	54,0	23,1	3100
	159	407,0	32,2	12,7	57,8	27,7	3600
	267	487,4	0,0	12,4	52,0	22,7	4200
	324	514,8	77,3	30,4	63,1	30,3	3800
	358	520,2	29,5	26,7	63,1	30,3	2600
	394	410,2	0,0	12,4	45,6	21,8	4200
	432	643,5	73,8	23,0	53,5	28,5	4500
	Média	517,2	31,4	18,8			
	Mediana	514,8	29,5	14,1			

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

107	Amostra	6-TGN	6-MP	MMP	6-MP	MTX	Leucócitos
	150	267,4	22,9	18,1	52,9	23,8	2900
	204	315,8	0,0	14,6	50,5	25,0	2500
	237	328,1	23,8	4,2	37,8	25,0	2100
	299	388,2	0,0	7,7	48,3	23,9	3200
	373	584,2	0,0	13,2	48,3	20,2	3580
	399	387,8	0,0	16,7	52,0	25,0	2650
	445	399,2	0,0	13,0	52,0	25,0	1900
	Média	381,5	6,7	12,5			
Mediana	387,8	0,0	13,2				
85	Amostra	6-TGN	6-MP	MMP	6-MP	MTX	Leucócitos
	157	323,0	22,3	2,6	55,5	33,3	13400
	175	696,2	46,8	16,0	65,1	39,0	4100
	203	519,9	105,8	45,9	91,1	46,8	3100
	274	579,1	0,0	13,1	87,0	37,3	3000
	400	432,7	0,0	11,0	49,0	36,7	3700
	450	546,7	0,0	6,3	73,5	44,1	4200
	Média	516,3	29,1	15,8			
	Mediana	533,3	11,1	12,1			
75	Amostra	6-TGN	6-MP	MMP	6-MP	MTX	Leucócitos
	178	271,3	21,7	8,6	51,3	23,2	4000
	212	191,0	0,0	3,4	51,3	23,2	4200
	222	256,3	0,0	6,8	54,1	27,2	2700
	Média	239,6	7,2	6,3			
Mediana	256,3	0,0	6,8				
38	Amostra	6-TGN	6-MP	MMP	6-MP	MTX	Leucócitos
	211	219,5	0,0	0,0	52,9	23,5	4300
	252	411,6	0,0	7,5	58,1	23,2	4600
	305	73,4	0,0	0,3	58,1	23,2	3300
	379	331,8	0,0	4,7	47,8	24,1	3170
	427	455,5	16,6	3,8	55,5	25,5	4750
	451	384,1	19,6	4,2	55,5	25,5	4800
	542	349,0	0,0	1,4	38,8	25,0	6600
	Média	317,9	5,2	3,1			
Mediana	349,0	0,0	3,8				
1	Amostra	6-TGN	6-MP	MMP	6-MP	MTX	Leucócitos
	214	428,2	0,0	12,2	47,1	23,5	2600
	262	490,0	0,0	2,4	35,3	23,5	4700
	328	319,7	0,0	0,9	33,4	22,3	4900
	381	389,2	0,0	4,2	33,4	22,3	4470
	457	409,4	12,3	5,4	36,5	26,3	3860
	501	523,2	7,9	2,6	43,8	26,3	5870
	550	623,5	11,1	12,8	51,6	26,3	4820
	Média	386,3	4,8	4,5			
Mediana	399,3	0,0	4,0				
42	Amostra	6-TGN	6-MP	MMP	6-MP	MTX	Leucócitos
	206	177,8	0,0	0,0	66,6	33,3	4600
	248	109,1	0,0	12,3	48,7	24,6	5000
	330	247,6	0,0	22,5	63,2	40,5	3900
	376	526,4	97,8	30,5	62,5	40,0	2600
	424	243,7	48,3	21,9	62,5	37,5	2130
	478	208,2	79,1	17,5	60,9	24,3	3500
	Média	252,1	37,5	17,5			
	Mediana	225,9	24,2	19,7			

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

10	Amostra	6-TGN	6-MP	MMP	6-MP	MTX	Leucócitos
	228	608,5	0,0	13,1	72,1	25,0	5300
	303	465,9	0,0	12,4	60,6	24,5	5300
	372	287,2	0,0	0,0	29,7	22,8	2600
	436	316,6	24,1	5,6	28,2	22,0	5850
	492	307,0	0,0	2,6	27,3	24,5	4410
	552	197,5	0,0	1,4	30,2	24,1	3340
	634	282,2	0,0	3,5	37,3	26,8	3850
	Média	352,2	3,4	5,5			
Mediana	307,0	0,0	3,5				
13	Amostra	6-TGN	6-MP	MMP	6-MP	MTX	Leucócitos
	250	550,0	64,9	16,5	75,7	30,9	4100
	323	243,4	0,0	14,6	56,4	28,8	2500
	374	505,8	0,0	24,9	84,7	35,5	4200
	435	483,8	43,9	14,9	69,4	31,6	3600
	487	397,6	43,6	11,2	55,5	26,6	3800
	540	624,4	25,6	5,3	53,7	25,8	2900
	Média	467,5	29,7	14,6			
	Mediana	494,8	34,6	14,8			
45	Amostra	6-TGN	6-MP	MMP	6-MP	MTX	Leucócitos
	245	308,2	13,8	7,0	51,2	24,6	3700
	310	228,1	0,0	4,6	37,8	30,3	3600
	331	120,7	0,0	7,2	37,8	30,3	4700
	387	205,3	0,0	2,3	36,7	44,1	2340
	460	375,6	37,5	15,6	46,9	28,1	2680
	610	161,2	20,7	6,6	33,3	33,3	2400
	626	232,4	0,0	7,7	32,8	33,3	1550
	Média	233,1	10,3	7,3			
Mediana	228,1	0,0	7,0				
15	Amostra	6-TGN	6-MP	MMP	6-MP	MTX	Leucócitos
	249	738,7	41,2	14,4	54,1	23,3	3000
	294	698,9	0,0	11,1	48,7	23,3	3600
	359	488,7	0,0	0,0	45,7	23,0	2200
	413	1007,0	19,2	15,1	53,5	25,0	2520
	475	708,8	0,0	6,3	50,3	25,6	3760
	518	859,1	16,4	6,3	54,8	19,7	2480
	Média	750,2	12,8	8,9			
	Mediana	723,7	8,2	8,7			
12	Amostra	6-TGN	6-MP	MMP	6-MP	MTX	Leucócitos
	93	206,8	16,6	4,3	57,5	36,3	5200
	136	259,9	41,1	12,5	61,3	30,6	3500
	Média	233,3	28,8	8,4			
Mediana	233,3	28,8	8,4				
109	Amostra	6-TGN	6-MP	MMP	6-MP	MTX	Leucócitos
	221	777,8	22,0	2,3	48,3	21,7	3200
	261	508,6	0,0	3,0	48,6	21,8	5000
	300	477,1	22,2	3,5	49,3	22,2	3700
	375	251,7	0,0	1,3	34,2	17,1	3700
	Média	503,8	11,1	2,5			
Mediana	492,8	11,0	2,7				
113	Amostra	6-TGN	6-MP	MMP	6-MP	MTX	Leucócitos
	297	409,9	64,2	17,1	41,6	20,8	3300
	343	297,1	0,0	12,4	41,6	20,8	4100
	365	254,5	64,7	14,1	48,6	25,0	2900
	385	407,2	0,0	16,0	41,6	25,0	4200
	Média	342,2	32,2	14,9			
Mediana	352,2	32,1	15,1				

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

29	Amostra	6-TGN	6-MP	MMP	6-MP	MTX	Leucócitos
	417	334,2	0,0	0,0	35,0	18,0	2500
	463	258,7	0,0	5,8	30,0	18,0	3200
	Média	296,4	0,0	2,9			
	Mediana	296,4	0,0	2,9			
36	Amostra	6-TGN	6-MP	MMP	6-MP	MTX	Leucócitos
	500	210,0	0,0	0,8	24,6	16,4	2270
	559	126,5	0,0	0,1	24,5	16,3	3170
	601	194,0	0,0	0,0	24,5	16,3	3150
	644	176,3	18,1	0,5	24,6	16,4	2200
	Média	176,7	4,5	0,4			
Mediana	185,1	0,0	0,3				
101	Amostra	6-TGN	6-MP	MMP	6-MP	MTX	Leucócitos
	489	1247,6	0,0	0,1	52,9	39,6	3600
	541	1350,8	7,7	2,6	59,5	39,6	3600
	604	894,7	0,0	1,1	56,8	37,8	2780
	642	1220,0	8,5	1,8	56,8	37,8	3400
	Média	1178,3	4,0	1,4			
Mediana	1233,8	3,8	1,4				
68	Amostra	6-TGN	6-MP	MMP	6-MP	MTX	Leucócitos
	483	209,0	0,0	2,1	38,3	24,1	4030
	519	296,1	0,0	2,1	38,3	24,1	4300
	573	240,7	19,8	4,3	50,2	28,7	3790
	639	202,6	0,0	4,8	57,4	28,7	3480
	Média	237,1	5,0	3,3			
Mediana	224,8	0,0	3,2				

- Dose de 6-MP: Dose prescrita nas quatro semanas que antecederam a coleta do sangue - para dosagem dos metabólitos (mg/m²/dia)
- Dose MTX: Dose prescrita nas quatro semanas que antecederam a coleta do sangue para dosagem dos metabólitos (mg/m²/semana)
- 6-TGN- concentração intra-eritrocitária de 6-TGN (pmol/8x10⁸ hemácias/200µl)
- 6-MP- concentração intra-eritrocitária de 6-MP (pmol/8x10⁸ hemácias/200µl)
- MMP- concentração intra-eritrocitária de MMP (nmol/8x10⁸ hemácias/200µl)

**8.8- ANEXO 8: TABELA COM OS DADOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS DOS 116
PACIENTES COM LLA INCLUÍDOS NO ESTUDO**

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ID	SEXO	IDADE-DX	LEUINI	MEDLEU	MEDNEU	6MP	MTX	QTT	TPMT	GENÓTIPO	6-TGN	MMP
1	1	7,0	25300	3900	2155	42,36	22,97	0,045	1	TPMT*1/*1	386,3	4,5
2	1	3,3	8400	4000	1702,5	52,78	24,36	0,08	1	TPMT*1/*1	319,2	9,0
3	1	2,5	2000	3350	1600	39,3	22,1	0,18	1	TPMT*1/*1		
4	1	11,9	1000	2600	1200	28,2	14,21	0,05	1	TPMT*1/*1	358,2	1,1
5	2	2,0	5700	6900		59,3	27,85	0,46	0	TPMT*1/*3A		
6	2	3,1	88100	2275	647	42,6	23	0,06	1	TPMT*1/*1		
7	2	11,3	180700	3500	1325	33,5	15,6	0,042	1	TPMT*1/*1		
8	1	5,5	24900	3685	2130	46,3	22,14	0,151	1	TPMT*1/*1		
9	1	6,3	3100	3000	1182			0,22	1	TPMT*1/*1		
10	1	3,9	4600	3015	1416	31,53	14,13	0,128	1	TPMT*1/*1		
11	1	4,8	7390	4050	2262			0,235	1	TPMT*1/*1		
12	2	14,3	187000	4800	3052	55	27,19	0,08	1	TPMT*1/*1	233,3	8,4
13	2	1,9	32000	4000	1976	51,1	24,8	0,095	1	TPMT*1/*1	467,5	14,6
14	2	1,3	62300	4233		56,7	28,6	0,07	1	TPMT*1/*1		
15	2	4,8	2200	2970	1484	45	17,7	0,088	1	TPMT*1/*1	750,2	8,9
16	2	8,8	31600	3800	1808	48,4	12,4	0,12	1	TPMT*1/*1		
17	2	2,0	157000	3070	1409,8	31,1	11,34	0,15	0	TPMT*1/*3A		
18	2	1,7	55800	3340	2464	43,25	21,39	0,12	1	TPMT*1/*1	244,3	4,0
19	1	9,9	374000	2750	752,5	31,5	15,9	0,12	1	TPMT*1/*1		
20	1	12,5	7600	3280	1968	26,45	16,5	0,3324	1	TPMT*1/*1		
21	2	1,5	26000	3750	1798	53,4	23,1	0,02	1	TPMT*1/*1		
22	2	8,1	5900	3500	1561	49	28,2	0,053	1	TPMT*1/*1	329,0	6,2
23	1	14,7	18800	2750	1820	44,43	22,79	0,11	0	TPMT*1/*3C		
24	2	3,3	19300	3650	1596	47,89	27,3	0,08	1	TPMT*1/*1	333,8	3,3
25	1	4,0	44000	3065	1404	45	20,7	0,06	1	TPMT*1/*1		
26	2	6,7	2100	3900	2257	50,96	24,02	0,075	1	TPMT*1/*1	420,3	15,3
27	2	0,0							1	TPMT*1/*1		
28	2	3,3	9900	3700	1215			0,289	1	TPMT*1/*1		
29	2	10,9	4700	2850	1652	24,6	16,9	0,16	1	TPMT*1/*1	296,4	2,9
30	1	4,9	10000	3000	1105,5	57,6	17,97	0,148	1	TPMT*1/*1		
31	1	14,4	10300	3775	2303	44,6	15,45	0	1	TPMT*1/*1		
32	1	5,8	40700	3350	1683			0,213	1	TPMT*1/*1		
33	1	5,1	3400	3940	1984	57,1	27,8	0	1	TPMT*1/*1		
34	2	3,3	6400	3500	1601	45,7	25,5	0,04	1	TPMT*1/*1		
35	2	5,6	24900	3730	1606	51,3	28	0,05	0	TPMT*1/*3A		
36	1	16,3	2000	3000	1587	26,4	16,2	0,07	1	TPMT*1/*1	176,7	0,4
37	1	1,7	138000	5500	2226	53,95	24,92	0,156	1	TPMT*1/*1		
38	1	5,8	5000	3800	1932	46,1	22,9	0,089	1	TPMT*1/*1	317,9	3,1
39	1	1,6	6500	3680	1637	39,12	12,06	0,069	1	TPMT*1/*1		
40	1	3,3	1400	3675	1428	60	27,5	0,04	1	TPMT*1/*1		
41	1	2,7	61100	4475	2677,5	72,9	33	0,06	1	TPMT*1/*1		
42	2	4,2	5700	3500	1259	53,9	31,3	0,082	1	TPMT*1/*1	252,1	17,5
43	2	9,0	3000	2500	1518,5	40,13	14,06	0,055	1	TPMT*1/*1		
44	1	4,3	6380	2460	1567,5	29,1	15,53	0,106	0	TPMT*1/*2		
45	2	2,9	3300	3300	1258	35,09	27,5	0,135	1	TPMT*1/*1	233,1	7,3
46	2	2,5	900	2800	1000	19,1	12,64	0,06	1	TPMT*1/*1		
47	2	8,1	1000	3400	1836	45,85	24,19	0,062	1	TPMT*1/*1	370,0	3,2
48	1	10,0	106000	6200	3717	52,7	27,4	0,07	1	TPMT*1/*1		
49	2	7,6	6900	3505	2402	43	18,9	0,04	1	TPMT*1/*1		
50	1	3,6	4300	3100	1466	49,2	22,7	0,02	1	TPMT*1/*1		
51	1	13,2	5600	3115	1800	34,63	18,9	0,07	1	TPMT*1/*1		
52	1	3,6	35100	3750	1798	48,4	25,3	0,025	1	TPMT*1/*1		
53	1	1,8	43000	3900	1500	43,36	21,54	0,166	1	TPMT*1/*1		
54	1	4,0	3600	3400		57,7	26,5	0,09	0	TPMT*1/*3A		

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

55	2	2,0	800	7000	3871	52,9	25	0	1	TPMT*1/*1		
56	2	11,3	2200	3050	1610	34,5	16,7	0,187	0	TPMT*1/*3C	1597,1	0,7
57	2	3,0	1000	3710	1505	38,2	18,1	0,15	1	TPMT*1/*1		
58	2	13,3	9600	1334		52,8	28	0,04	1	TPMT*1/*1		
59	2	2,8	7850	3670	1858	31,13	11,62	0,068	1	TPMT*1/*1		
60	2	3,2	28000	3200	1740	35,71	14,92	0,12	0	TPMT*1/*3A		
61	2	12,6	1600	3655	2220	38,43	8,4	0,098	1	TPMT*1/*1		
62	2	9,0	12900	3500	2387	50,6	66,4	0,03	1	TPMT*1/*1		
63	2	3,7	96000	2945	1401,5	49	46,2	0,09	1	TPMT*1/*1		
64	2	2,4	20700	3400	1580	40,7	17,6	0,104	1	TPMT*1/*1	295,6	7,8
65	2	2,8	120000	1505		46,3	17,9	0,15	1	TPMT*1/*1		
66	1	2,5	800	4100	1917	45,4	22,6	0,19	1	TPMT*1/*1	355,9	1,7
67	1	5,6	10200	3030	1680	39,3	19,63	0,04	1	TPMT*1/*1		
68	1	3,1	196000	3760	2279	47,02	25,6	0	1	TPMT*1/*1	237,1	3,3
69	2	7,7	8600	3500	1663	51,8	30,3	0,027	1	TPMT*1/*1	393,6	7,0
70	1	2,7	5600	3850	1656	63,6	29,1	0,075	1	TPMT*1/*1	209,9	13,7
71	1	1,2	52200	4400	1794	56,92	31,55	0,143	1	TPMT*1/*1		
72	2	6,8	5100	4200	4200	52,4	31,68	0,05	1	TPMT*1/*1	517,2	18,8
73	2	7,5	700	2550	1374	33,46	19,14	0,088	1	TPMT*1/*1	272,0	4,9
74	2	5,6	6400	3700	1669	59,2	26,16	0,116	1	TPMT*1/*1	157,0	0,0
75	2	4,8	2300	4100	1947	46,05	21,68	0,11	1	TPMT*1/*1	239,6	6,3
76	1	3,3	36100	3700	1332	56,63	21,59	0,099	1	TPMT*1/*1	380,6	13,8
77	2	9,2	5100	4070	2779	45,7	21,4	0,16	1	TPMT*1/*1		
78	1	6,7	92900	4000	2120	44,22	28,42	0,03	1	TPMT*1/*1		
79	1	3,5	5200	4180	2670	74,9	19,6	0,13	1	TPMT*1/*1		
80	1	8,5	2100	3300	1470	58,77	29,1	0,055	1	TPMT*1/*1	295,4	17,5
81	1	1,2	14800	5100	2247	52,7	38,44	0,012	1	TPMT*1/*1		
82	1	10,8	3350	2900	1608,5	45,97	23,81	0,029	1	TPMT*1/*1		
83	2	3,3	42300	3300	1853	53,36	30,71	0,009	1	TPMT*1/*1	171,0	8,5
84	2	3,6	1900	3100	1834	41,7	18,2	0,13	1	TPMT*1/*1		
85	1	3,5	16300	4300	2016	66,9	34,6	0,065	1	TPMT*1/*1	516,3	15,8
86	1	0,6	32800	5100	2439	59,39	26,04	0,136	1	TPMT*1/*1		
87	1	4,5	25500	3250	1532	45,1	24,8	0,08	1	TPMT*1/*1		
88	1	12,2	2600	2920	1295	32,73	20,11	0,01	1	TPMT*1/*1		
89	2	6,4	3400	3550		52,6	30,9	0,01	1	TPMT*1/*1		
90	2	4,1	9300	2375	1567	41,87	20,47	0,23	1	TPMT*1/*1		
91	1	3,3	2600	4000	1133	58,3	26,24	0,066	1	TPMT*1/*1		
92	1	5,9	7500	3520	1809	31,47	15,56	0,057	1	TPMT*1/*1		
93	2	13,1	359000	3920	2517	57,77	26,41	0,015	0	TPMT*1/*3A		
94	1	3,1	2900	1160		55,6	35,1	0,09	1	TPMT*1/*1		
95	2	9,8	5600	3000	1209	42	17,2	0,14	1	TPMT*1/*1		
96	1	5,9	48400	3500	2185	29,87	23	0,055	1	TPMT*1/*1		
97	2	3,4	6610	3200	1246			0,15	1	TPMT*1/*1		
98	2	8,6	5980	3265	1955,5	52,8	24,06	0	1	TPMT*1/*1		
99	1	6,4	7800	2490	1348	18,47	13,54	0,091	0	TPMT*1/*3A		
100	2	2,2	11800	3350	1565	42,3	27,8	0,039	1	TPMT*1/*1		
101	2	1,5	272000	3500	1833	42,8	30,05	0,182	1	TPMT*1/*1	139,0	3,3
102	2	3,5	7700	3850	2052	48,2	14,68	0,025	1	TPMT*1/*1		
103	2	7,8	9100	3110	1367	30,7	16,5	0,09	1	TPMT*1/*1		
104	2	6,1	2800	3600	1137	38,3	21,5	0,064	0	TPMT*1/*3A		
105	2	3,0	6400	4130	1610	45,92	21,71	0,065	1	TPMT*1/*1		
106	2	2,4	5000	4615	2157	40,54	23,54	0,055	1	TPMT*1/*1	352,2	5,5
107	1	2,9	22300	2790	1225	48,9	23,5	0,009	1	TPMT*1/*1	381,5	12,5
108	1	3,6	36800	4000		61,3	35	0,03	1	TPMT*1/*1		
109	1	10,9	2600	3500	1936	41,66	19,26	0,043	1	TPMT*1/*1	503,8	2,5
110	1	1,9	4300	3250	1360	46,26	22,1	0,059	1	TPMT*1/*1		

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

111	1	10,4	376000	4260	2595	51,87	22,42	0,034	1	<i>TPMT*1/*1</i>		
112	1	5,9	150000	2700	1458	47,05	21,94	0,082	1	<i>TPMT*1/*1</i>		
113	2	7,4	49000	3700		40,16	20,08	0,142	1	<i>TPMT*1/*1</i>	342,2	14,9
114	1	2,6	594	4880	1903			0,35	1	<i>TPMT*1/*1</i>		
115	1	15,4	89600	3500	1266,5	30,29	12,08	0,036	1	<i>TPMT*1/*1</i>		
116	1	7,7	33200	4300	2440	43,05	16,91	0,07	0	<i>TPMT*1/*3A</i>		

- ID – número de identificação
- SEX0: 1- masculino e 2- feminino.
- IDADEDX: idade ao diagnóstico em anos número fracionado em meses, obtido pela subtração da data de nascimento em relação à data do diagnóstico de leucemia.
- LEUINI: leucometria global ao diagnóstico.
- MEDLEU: mediana da contagem de leucócitos durante a fase de manutenção do tratamento.
- MEDNEU: mediana da contagem de neutrófilos durante a fase de manutenção do tratamento.
- 6-MP: média das doses de 6-MP prescritas para cada criança durante a fase de manutenção (mg/m²/dia).
- MTX: média das doses de MTX prescritas para cada criança durante a fase de manutenção (mg/m²/semana).
- QTT: tempo total de interrupção da quimioterapia durante a fase de manutenção (número de dias sem quimioterapia/ total de dias de duração da fase de manutenção).
- TPMT: 0- criança com mutação em algum dos alelos *TPMT* estudados e 1- criança sem mutação nos alelos *TPMT* estudados.
- 6-TGN: média das dosagens do metabólito 6-TGN apresentadas pelo paciente durante a fase de manutenção do tratamento (pmol/8x10⁸ hemácias).
- MMP: média das dosagens do metabólito MMP apresentadas pelo paciente durante a fase de manutenção do tratamento (nmol/8x10⁸ hemácias).
- GENÓTIPO: se o paciente é homozigoto para o alelo normal (*TPMT*1/*1*) ou se é heterozigoto para as mutações (*TPMT*1/*2* ou *TPMT*1/*3A* ou *TPMT*1/*3C*).